

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Sistemas de liberación controlada de celecoxib para el tratamiento de tumores cerebrales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Vera Sarriá

Directoras

Ana M^a Fernández-Carballido
Emilia M^a Barcia Hernández

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA
DE CELECOXIB PARA EL TRATAMIENTO DE
TUMORES CEREBRALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

MARÍA VERA SARRÍA

Bajo la dirección de las doctoras:

Ana M^a Fernández-Carballido

Emilia M^a Barcia Hernández

Madrid, 2014



FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA**

Memoria presentada por María Vera Sarría para optar al
Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense
de Madrid.

Fdo.: María Vera Sarría

VºBº

Los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Ana Mª Fernández-Carballido
Prof. Contratado Doctor del Dpto. de
Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia U.C.M.

Fdo: Emilia Mª Barcia Hernández
Prof. Titular del Dpto. de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia U.C.M.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han colaborado en el proceso de realización de esta tesis doctoral.

En particular deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de tesis, las Dras. Ana M^a Fernández-Carballido y M^a Emilia Barcia Hernández; por haber confiado en mí, por su paciencia, por dirigir este trabajo y por ver siempre el lado positivo de las cosas cuando yo no lo veía.

También mi más cordial agradecimiento a la Dra. M^a Sofía Elisa Negro Álvarez por su apoyo y sus buenos consejos.

Gracias a los profesores y doctorandos del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por guiarme cuando lo he necesitado pero en especial a cuatro personas; a Bea por haber empezado este largo camino juntas, a Virginia por iniciarme en este mundo, a Ana por su gran apoyo y por los buenos ratos, y a Patri por estar siempre ahí, sobre todo en los momentos de rotavapor.

Especialmente a mis padres y mi hermano que me han apoyado de forma incondicional y por haber soportado mis momentos más difíciles.

A Juanjo que desde un principio hasta el día de hoy me sigue animando en todo.

ÍNDICE

<i>I- CELECOXIB</i>	<i>1</i>
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DEL CELECOXIB	3
3. ACCIONES FARMACOLÓGICAS	4
4. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS	5
5. APLICACIONES CLÍNICAS	8
6. BIBLIOGRAFÍA	11
 <i>II- DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CELECOXIB</i>	 <i>17</i>
1. INTRODUCCIÓN	19
2. OBJETIVO	19
3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CELECOXIB	20
3.1. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	20
3.2. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV	24
4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN	25
4.1. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	25
4.2. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV	34
5. CONCLUSIONES	41
6. BIBLIOGRAFÍA	42

**III- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL
CELECOXIB EN CULTIVOS CELULARES _____ 43**

1. INTRODUCCIÓN	45
2. OBJETIVO	48
3. CONDICIONES EXPERIMENTALES	49
3.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LA LÍNEA CELULAR PC12	49
o Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo	50
o Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo	51
3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LAS LÍNEAS CELULARES SKN-AS Y U373-MG	52
o Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo	54
o Cálculo de la concentración efectiva 50% (EC 50)	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LA LÍNEA CELULAR PC12	55
4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LAS LÍNEAS CELULARES SKN-AS Y U373-MG	64
5. CONCLUSIONES	70
6. BIBLIOGRAFÍA	71

IV- ELABORACIÓN DE MICROESFERAS DE CELECOXIB ____ 77

1. INTRODUCCIÓN	79
2. OBJETIVO	84
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
o Preparación de microesferas de celecoxib	85
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS	89
4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS	89

o	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	89
o	Distribución del tamaño de partícula por difracción de rayos láser	89
4.2.	DIFRACCIÓN DE RAYOS X	90
4.3.	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	90
4.4.	DETERMINACIÓN DE LAS EFICACIAS DEL PROCESO Y DE ENCAPSULACIÓN	91
4.5.	ENSAYOS DE CESIÓN	92
5.	RESULTADOS	93
5.1.	ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS MICROESFERAS	93
o	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	93
o	Distribución del tamaño de partícula por difracción de rayos láser	95
5.2.	DIFRACCIÓN DE RAYOS X	97
5.3.	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	99
5.4.	EFICACIAS DEL PROCESO Y DE ENCAPSULACIÓN	101
5.5.	ESTUDIOS DE CESIÓN	104
6.	CONCLUSIONES	110
7.	BIBLIOGRAFÍA	111

V- ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE CELECOXIB **117**

1.	INTRODUCCIÓN	119
2.	OBJETIVO	127
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	128
o	Método de elaboración de nanopartículas de CXB no recubiertas	128
o	Método de elaboración de nanopartículas de CXB recubiertas con polisorbato 80	130
4.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	131
4.1.	ESTUDIOS MORFOLÓGICOS	131
o	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	131
o	Difracción de rayos láser	132
o	Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	132

4.2.	CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA _____	133
4.3.	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) _____	134
4.4.	RENDIMIENTO DEL PROCESO Y EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN _____	135
4.5.	ESTUDIOS DE CESIÓN _____	136
4.6.	EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL PASO DE LAS NANOPARTICULAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA _____	138
5.	RESULTADOS _____	139
5.1.	ESTUDIOS MORFOLÓGICOS _____	139
o	Microscopía electrónica de barrido (SEM) _____	139
o	Difracción de rayos láser _____	142
o	Microscopía de transmisión electrónica (TEM) _____	146
5.2.	CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA _____	148
5.3.	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) _____	149
5.4.	RENDIMIENTO DEL PROCESO Y EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN _____	151
5.5.	ESTUDIOS DE CESIÓN _____	153
5.6.	ESTUDIOS DE PASO A TRAVÉS DE BHE _____	157
6.	CONCLUSIONES _____	161
7.	BIBLIOGRAFÍA _____	163
	<i>SUMMARY</i> _____	<i>171</i>

I- CELECOXIB

1. INTRODUCCIÓN

El celecoxib (CXB) es un agente antiinflamatorio, analgésico, antipirético e inhibidor de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Este grupo de compuestos representa un nuevo grupo farmacológico dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que se caracteriza por una inhibición selectiva de la ciclooxigenasa-2 a las dosis farmacológicas, y que han demostrado ser eficaces en clínica (*Ruilope y Coca, 2002*).

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL CELECOXIB

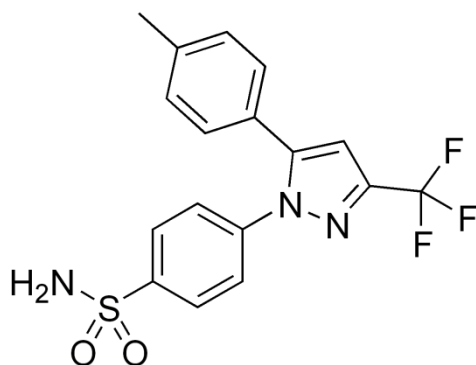


Figura 1.- Estructura del celecoxib.

El CXB corresponde a la 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-ilo] bencenosulfonamida, con fórmula empírica C₁₇H₁₄F₃N₃O₂S. Tiene un peso molecular de 381,37 g/mol. Se presenta como polvo blanco cristalino con un punto de fusión de 157-159 °C (*Simon y col., 1998*). Su solubilidad en agua es <1 mg/ml a 25 °C. Es

soluble en metanol, etanol (33 mg/ml a 25 °C), propilenglicol, acetato de etilo, diclorometano y acetonitrilo.

3. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

El CXB es un pirazol diaril sustituido, químicamente similar a otras sulfamidas no arilaminas y distinto de las sulfamidas arilaminas. Es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) activo por vía oral (*Altorki y col., 2003*). La ciclooxigenasa (COX) es un enzima que cataliza la síntesis de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico presente en las membranas de distintos tipos celulares. Se han identificado dos isoformas: la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que tienen distinto patrón de distribución y síntesis, y están ligadas a genes presentes en distintos cromosomas.

A pesar de la similitud estructural que exhiben las dos isoformas, difieren significativamente en la regulación de su expresión y en su función, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (*Kaufman y col., 1997*).

La COX-1 es una enzima constitutiva de casi todos los tejidos, pero muy especialmente de riñón y tracto gastrointestinal. Su actividad tiene que ver con la participación de las prostaglandinas y los tromboxanos en el control de funciones fisiológicas. Así es responsable de proteger al epitelio gástrico, al funcionamiento renal, así como de intervenir en la agregación de las plaquetas (*Fu y col., 1990; Xie y col., 1991*).

La COX-2 por el contrario, parece expresarse en algunas células bajo el efecto inductor de determinados estímulos como algunos mediadores químicos de la inflamación; por tanto, mantiene los mecanismos inflamatorios y amplifica las señales dolorosas que surgen en las áreas de inflamación (*Tive, 2000*).

Además de su participación en la inflamación, numerosos estudios han demostrado que la enzima COX-2 está sobre-expresada en una gran variedad de tumores sólidos humanos como los de colon, mama, pulmón, páncreas, nasofaringe y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sugiriendo que puede desempeñar un papel importante en la progresión de los mismos (*Jendrossek, 2011*).

Por tanto, la inhibición selectiva de la enzima COX-2 supone una buena estrategia farmacológica para la quimioprotección del cáncer humano, además de evitar los efectos adversos típicos de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), tales como la toxicidad gástrica, renal e inhibición plaquetaria (*Brooks y col., 1999; Grau de Castro, 2005*).

4. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS

El CXB se administra principalmente por vía oral ya que presenta una biodisponibilidad elevada (>80%), alcanzándose las concentraciones plasmáticas máximas a las 2-3 horas después de la administración. Su administración con alimentos ricos en lípidos retrasa

la absorción unas 2-4 horas e incrementa la biodisponibilidad en un 10-20% (*FitzGerald y Patrono, 2001*). Las concentraciones plasmáticas en estado estacionario se alcanzan unos 5 días después de iniciado el tratamiento. En su proceso de distribución por el organismo el CXB circula unido a proteínas plasmáticas en un 97%.

Se elimina principalmente por metabolismo hepático, apareciendo menos del 3% de la dosis administrada de forma inalterada en orina (*Paulson y col., 2000*). La semivida plasmática de eliminación del CXB es de 8-12 horas. Su metabolismo está mediado sobre todo por el citocromo P450 2C9, habiéndose identificado tres metabolitos sin actividad inhibidora de COX-1 ni COX-2 (un alcohol primario, el ácido carboxílico correspondiente y su conjugado glucurónido) (*Davies y col., 2000; Goldstein y col., 2001*). El CXB presenta farmacocinética lineal en el rango de dosis terapéuticas.

La actividad del citocromo P450 2C9 se ve modificada en individuos con polimorfismos genéticos que conllevan una actividad enzimática reducida, como los homocigóticos para el polimorfo CYP2C9*3. El CXB debe ser administrado con precaución en los pacientes que presenten, o se sospeche que puedan presentar metabolización lenta mediada por el CYP2C9.

Comparados con las personas con función hepática normal, los pacientes con insuficiencia hepática leve presentan un incremento medio del 53% en la C_{max} y del 26% en el área bajo la curva de niveles plasmáticos-tiempo (AUC) de CXB. En pacientes con insuficiencia hepática moderada (albúmina sérica de 25-35 g/l), la dosis diaria recomendada de CXB debe reducirse un 50%.

La mayor seguridad gastrointestinal que presenta este grupo de fármacos, no significa necesariamente que estén libres de todo riesgo. De hecho, la COX-2 juega un papel homeostático importante en diversos órganos, por lo que fármacos inhibidores selectivos del enzima, presentan otros efectos secundarios típicos de los AINEs clásicos, como son las alteraciones de la función renal y del metabolismo hidroelectrolítico (*Salido y col., 2001*).

Los inhibidores selectivos de la COX-2 ejercen importantes efectos cardiovasculares adversos, que incluyen aumento del riesgo de infarto del miocardio, de accidente cerebrovascular, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal e hipertensión arterial (*Bresalier y col., 2005; Abraham y col., 2007*). Esto se produce porque el CXB no tiene propiedades antitrombóticas, ya que las plaquetas expresan primariamente la COX-1, produciéndose una desviación del balance protrombótico/antitrombótico en la superficie endotelial que da lugar a una propensión a la trombosis. En isquemia miocárdica y en el infarto de miocardio lo que ocurre es una pérdida del efecto protector de la regulación de la COX-2 (*Mkherjee, 2006*). El riesgo de estos efectos adversos es mayor en pacientes con historia previa de enfermedad cardiovascular o con alto riesgo para desarrollarla. En estos pacientes, el uso de inhibidores de la COX-2 se debe limitar a aquellos casos para los que no hay alternativa terapéutica, únicamente a dosis bajas y durante el menor tiempo necesario.

Otros efectos secundarios característicos del CXB son (*Bhala y col., 2013*):

- Infecciones e infestaciones: sinusitis, infección del tracto respiratorio superior.
- Trastornos psiquiátricos: insomnio.
- Trastornos del sistema nervioso: mareos.
- Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos: faringitis, rinitis.
- Trastornos gastrointestinales: dolor abdominal, diarrea, dispepsia, flatulencia.
- Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo: exantema.
- Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración: edema periférico, retención de líquidos.

5. APLICACIONES CLÍNICAS

El CXB fue utilizado inicialmente para el tratamiento del dolor y la inflamación, buscando minimizar los efectos adversos gastrointestinales propios de los AINEs. En la actualidad se utiliza fundamentalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, artrosis y espondilitis anquilosante (*Crofford y col., 2000*), siendo importante destacar su uso también para el tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar (PAF).

En muchas lesiones premalignas (pólipos adenomatosos colorrectales) y cánceres epiteliales se observan niveles elevados de COX-2 (*Rex, 2002; Núñez Martínez y col., 2006*).

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es una enfermedad genética debida a una alteración autosómica dominante de un gen supresor tumoral o gen de la poliposis adenomatosa colónica (APC). Los pólipos con la mutación del APC sobreexpresan la COX-2 y si no se tratan, estos pólipos siguen formándose y creciendo en el colon o el recto, lo que puede conducir al desarrollo de cáncer en casi el 100% de los casos (*Parés y col., 2006*).

Se ha comprobado que el mecanismo de acción por el que el CXB produce la muerte tumoral puede estar relacionado con la inducción de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis. La inhibición de la COX-2 puede tener consecuencias sobre la viabilidad tumoral.

El CXB inhibe la formación de tumores en los modelos preclínicos de carcinogénesis colónica, en el que se da la sobreexpresión de la COX-2, ya sea inducida por carcinógenos químicos o por mutaciones genéticas (*Subongkot y Frame, 2003*).

En un principio se creía que al sobreexpresar la COX-2 el CXB actuaría reduciendo los pólipos ya existentes (*Steinbach y col., 2000*) sin embargo, hoy en día no está clarificada la vía exacta de actuación de este agente, habiéndose descartado que sea por su efecto inhibitorio de la COX-2. En estudios recientes se ha demostrado que la administración a pacientes de dosis de 100-200 mg de CXB de forma crónica no reduce

significativamente el tamaño de los pólipos, obteniéndose una reducción estadísticamente significativa cuando se aumentó la dosis a 800 mg (*Grösch y col., 2001*).

La COX-2 también está involucrada en la ovulación, implantación y cierre del ductus arteriosus, regulación de la función renal y de determinadas funciones del sistema nervioso central (inducción de la fiebre, percepción del dolor y función cognitiva). También parece estar implicada en la cicatrización de úlceras. Aunque se ha identificado la presencia de COX-2 en tejidos próximos a úlceras gástricas, no se ha establecido su relevancia en la cicatrización ulcerosa (*Ruilope y Coca, 2002*).

En estudios recientes realizados en cultivos celulares y en modelos animales se ha observado que los inhibidores de la COX-2, a concentraciones elevadas, son capaces de inhibir el crecimiento de varios tipos de células tumorales. Dentro de los anti COX-2, el CXB ha sido objeto de muchos estudios buscando su uso para el tratamiento preventivo del cáncer. Sin embargo, teniendo en cuenta los graves efectos secundarios a nivel cardiaco de los anti-COX-2, será necesario evitar el empleo de los mismos a dosis elevadas (*Mkherjee y col., 2001*).

La diferencia en la actividad antiplaquetaria entre algunos AINES que inhiben la COX-1 y la COX-2 puede tener importancia clínica en los pacientes con riesgo de episodios tromboembólicos. Los inhibidores de la COX-2 reducen la formación de prostaciclina sistémica, sin afectar al tromboxano plaquetario (*Jouzeau y col., 2004*).

6. BIBLIOGRAFÍA

Abraham N.S., El-Sereg H.B., Hartman C., Richardson P., Deswal A. Cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of myocardial infarction and cerebrovascular accident. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25: 913-24, 2007.

Altorki N.K., Keresztes R.S., Port J.L., Libby M.D., Korst R.J., Flieder D.B., Ferrara C.A., Yankelevitz D., Subbaramaiah K., Pasmantier M.W., Dannenberg A.J. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21: 2645-2650, 2003.

Bhala N., Emberson J., Merhi A., Abramson S., Arber N., Baron J.A., Bombardier C., Cannon C., Farkouh M.E., FitzGerald G.A., Goss P., Halls H., Hawk E., Hawkey C., Hennekens C., Hochberg M., Holland L.E., Kearney P.M., Laine L., Lanus A., Lance P., Laupacis A., Oates J., Patrono C., Schnitzer T.J., Solomon S., Tugwell P., Wilson K., Wittes J., Baigent C. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 382(9894): 769-779, 2013.

Bresalier R.S., Sandler R.S., Quan H., Bolognese J.A., Oxenius B., Horgan K., Lines C., Riddell R., Morton D., Lanus A., Konstam M.A., Baron J.A. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N. Engl. J. Med.*, 352: 1092-102, 2005.

Brooks P., Emery P., Evans J.F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology*, 38: 779-788, 1999.

Crofford L.J., Lipsky P.E., Brooks P., Abramson S.B., Simon L.S., Van de Putte L.B.A. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.*, 43: 4-13, 2000.

Davies N.M., McLachlan A.J., Day R.O., Williams K.M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin. Pharmacokinet.*, 38: 225-242, 2000.

FitzGerald G.A., Patrono C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.*, 345: 433-442, 2001.

Fu J.Y., Masferrer J.L., Seibert K., Raz A., Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 265: 16737-16740, 1990.

Goldstein J.L., Correa P., Zhao W.W. Reduced incidence of gastroduodenal ulcers with celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, compared to naproxen in patients with arthritis. *Am. J. Gastroenterol.*, 96(4): 1019-1027, 2001.

Grau de Castro J.J. Inhibidores de la ciclooxygenasa-2 en la prevención del cáncer. *Rev. Clin Esp.*, 205: 446-456, 2005.

Grösch S., Tegeder I., Niederberger E., Braütigam L., and Geisslinger G.. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *The FASEB J.*, 15: 2742-2744, 2001.

Jendrossek V. Targetting apoptosis pathways by celecoxib in cancer. *Cancer Lett.*, 332(2): 313-324, 2011.

Jouzeau J.Y., Daouphars M., Benani A., Netter, P. Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroen. Clin. Biol.*, 28: 7-17, 2004.

Kaufmann W.E., Andreasson K.I., Isakson P.C., Worley P.F. Cyclooxygenase and the central nervous system. *Prostaglandins*, 54: 601-624, 1997.

Mkherjee D. Does a coxib-associated risk limit the clinical use of the compounds as analgesic anti-inflammatory drugs? Arguments in favor. *Thromb. Haemost.*, 96: 407-412, 2006.

Mkherjee D., Nissen S.E., Topol E.J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 286(8): 954-959, 2001.

Núñez Martínez O., Clemente, Parés D., Pera M., González S., Pascual Cruz M., Blanco I. Poliposis adenomatosa familiar. *Gastroenterología y Hepatología*, 29: 625-635, 2006.

Paulson S.K., Hribar J.D., Liu N.W., Hajdu E., Bible R.H. Jr., Piergies A., Karim A. Metabolism and excretion of [(14)C]celecoxib in healthy male volunteers. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 308-314, 2000.

Rex D.K. Screening for colon cancer and evaluation of chemoprevention with COXIBs. *J. Pain Manage.*, 23: 41-50, 2002.

Ruilope L.M., Coca A. Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (Coxibs) y morbilidad cardiovascular. *Medicina Clínica*, 118: 219-221, 2002.

Salido M., Abásolo I., Bañares, A. Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25(2): 46-52, 2001.

Simon L.S., Lanza F.L., Lipsky F.L., Hubbard R.C., Walter S., Schwartz B.D., Isakson P.C., Geis G.S. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor - Efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoidarthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum.*, 41: 1591-1602, 1998.

Steinbach G., Lynch P.M., Philips R., Wallace M.H, Hawk E., Gordon G., Wakabayashi N., Saunders B., Shen Y., Fujimura T., Su L., Levin B. The effect of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor in Familial Adenomatous Polyposis. *N. Engl. J. Med.*, 342(26): 1946-1952, 2000.

Subongkot S., Frame D. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition: A target in cancer prevention and treatment. *Pharmacotherapy*, 23(1): 9-28, 2003.

Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology*, 39(suppl.2): 21-28, 2000.

Xie W., Chipman J.G., Robertson D.L., Erikson R.L, Simmons D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 2692-2696, 1991.

II- DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CELECOXIB

1. INTRODUCCIÓN

Para el desarrollo de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el ingrediente activo de una formulación. Para garantizar que los análisis se realizan con la exactitud y precisión requeridas, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. La variación de los excipientes utilizados en las formulaciones o el desarrollo de nuevas formulaciones conducen necesariamente a la validación del método analítico. Mediante un proceso de validación se comprueba si el método es lo suficientemente preciso, exacto, sensible y selectivo para la cuantificación del ingrediente activo.

La búsqueda de métodos de análisis rápidos, selectivos y sensibles es uno de los objetivos esenciales en tecnología farmacéutica. Para la determinación analítica del CXB se han puesto a punto y desarrollado dos métodos de cuantificación: uno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otro por espectrofotometría UV.

2. OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio es desarrollar dos métodos analíticos de cuantificación de CXB que sean rápidos, selectivos, sensibles y exactos; uno mediante HPLC y otro por espectrofotometría UV.

Para ello se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Validación de un método de cuantificación de CXB por HPLC para la determinación de la cantidad de fármaco encapsulada en las micro y nanopartículas.
2. Validación de un método de cuantificación de CXB por espectrofotometría UV para la determinación de la cantidad de fármaco cedida en los estudios de cesión *in vitro*.

3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CELECOXIB

3.1. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

A partir del método descrito por Baboata y col. (*Baboata y col, 2007*), se ha realizado una optimización y validación del mismo para la detección y cuantificación del CXB (Hangzhou Onion Cem. Co. Ltd., China) en las formulaciones desarrolladas, con el fin de calcular la eficacia de encapsulación del compuesto en las micropartículas y en las nanopartículas. Este método resulta especialmente útil al permitir cuantificar el ingrediente activo sin la interferencia de los demás componentes de la formulación (polímero PLGA, PVA, etc.).

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Waters (EEUU) equipado con una bomba de distribución modelo 510 Waters, detector ultravioleta modelo 490E Waters a una

longitud de onda de 250 nm, inyector automático 717 Waters y un procesador de datos Windows XP.

Las pruebas que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener en el tiempo los criterios fundamentales de validación son, entre otros: linealidad, exactitud, precisión, selectividad y sensibilidad (*ICH, 2005*).

Linealidad

Para la determinación de la linealidad se parte de seis concentraciones distintas de CXB preparadas en fase móvil, que se analizan en tres días diferentes. Las concentraciones utilizadas fueron: 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 µg/ml, preparadas a partir de una solución madre de 500 µg/ml y diluidas posteriormente con fase móvil (metanol:agua, 75:25 v/v).

Para determinar si el método es lineal se realizan los siguientes tests estadísticos:

Test de proporcionalidad

Se emplea la prueba estadística de la t de Student para demostrar mediante un test de contraste de hipótesis si la ordenada pasa por el origen.

- H_0 (hipótesis nula): la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero.

- H_1 (hipótesis alternativa): la ordenada en el origen si difiere significativamente de cero.

Test de regresión

Mediante esta misma prueba estadística de la t de Student se demuestra que la pendiente es significativamente diferente de cero.

- H_0 (hipótesis nula): la pendiente no difiere significativamente de cero.
- H_1 (hipótesis alternativa): la pendiente sí difiere significativamente de cero.

Análisis de la varianza de la regresión

Para comprobar si los datos se ajustan al modelo lineal propuesto, se realiza un ANOVA de regresión en el que se comparan las variaciones debidas a la regresión frente a las debidas a los errores residuales (experimentales y de ajuste).

Exactitud

La determinación de la exactitud se realiza mediante el análisis por triplicado de muestras preparadas con las siguientes concentraciones de CXB: 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$. La exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra respecto a la teórica.

Precisión

La precisión se calcula a partir de la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad (precisión intermedia).

1. Repetibilidad

La repetibilidad del método se determina a través del coeficiente de variación del porcentaje de recuperación obtenido, analizando muestras de tres concentraciones distintas (2,5; 10 y 25 µg/ml) de CXB. Este estudio se repite en 3 días distintos.

2. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se determina a través del coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recuperación obtenido, analizando muestras de tres concentraciones de CXB (2,5; 10 y 25 µg/ml) en 3 días diferentes.

Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar, mientras que el límite de cuantificación (LQ) es la concentración más baja de analito que se puede determinar con una precisión y exactitud aceptables.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se ha considerado como desviación estándar (D.E.) de la respuesta, el error de la ordenada en el origen.

Límite de detección = 3,3 D.E./pendiente

Límite de cuantificación = 10 D.E./pendiente

Selectividad

La selectividad representa la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes.

3.2. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Se ha elegido la espectrofotometría UV (Beckman DU-7, Beckman Coulter, EEUU) directa a una longitud de onda de 252,5 nm, para la cuantificación de CXB en las muestras obtenidas en los estudios de cesión *in vitro* a partir de las formulaciones elaboradas (microesferas y nanopartículas).

La validación del método analítico se ha desarrollado de acuerdo con los criterios de linealidad, exactitud y precisión (*Caporal-Gautier y col., 1992a; Caporal-Gautier y col., 1992b; ICH, 2005*).

Para evaluar la linealidad y la exactitud del método empleado se han preparado tres series de soluciones de CXB utilizando como medio

de disolución el tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 3%. Las concentraciones de celecoxib preparadas fueron: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 y 25 µg/ml.

El estudio de precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del método analítico se ha llevado a cabo evaluando concentraciones repetidas de CXB en días consecutivos. Se han analizado seis series de concentraciones: 2,5; 10 y 25 µg/ml.

Todas las soluciones indicadas en la validación del método espectrofotométrico se han preparado a partir de pesadas iniciales de 25 mg de CXB.

4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN

4.1. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para la determinación del contenido de CXB en las microesferas y nanopartículas se ha puesto a punto y validado un método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, nos hemos basado en el método descrito por Baboata y col. (*Baboata y col., 2007*) que fue adaptado por nosotros de acuerdo a las siguientes condiciones de trabajo:

- Fase móvil: se ha utilizado una fase móvil consistente en una mezcla de metanol:agua (75:25, v/v). La fase móvil antes de ser empleada se hace pasar por filtros de membrana de nylon de tamaño de poro de 0,45 μm y se desgasifica.
- Flujo de la fase móvil: se ha seleccionado un flujo de 1 ml/min.
- Volumen de inyección: se ha empleado un volumen de inyección de 20 μl .
- Fase estacionaria: se ha utilizado una columna de fase reversa C18 (Mediterranea Sea 18 de Teknokroma Coop., Barcelona) de 5 μm y tamaño de 250 mm x 4mm.
- Longitud de onda: el máximo de absorbancia del CXB en solución se obtiene a 250 nm.
- Sensibilidad: se ha ajustado a 0,01.

Con las condiciones anteriormente indicadas, el pico correspondiente al CXB presenta un tiempo de retención de 7 min.

En la figura 2 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos en la cuantificación del CXB.

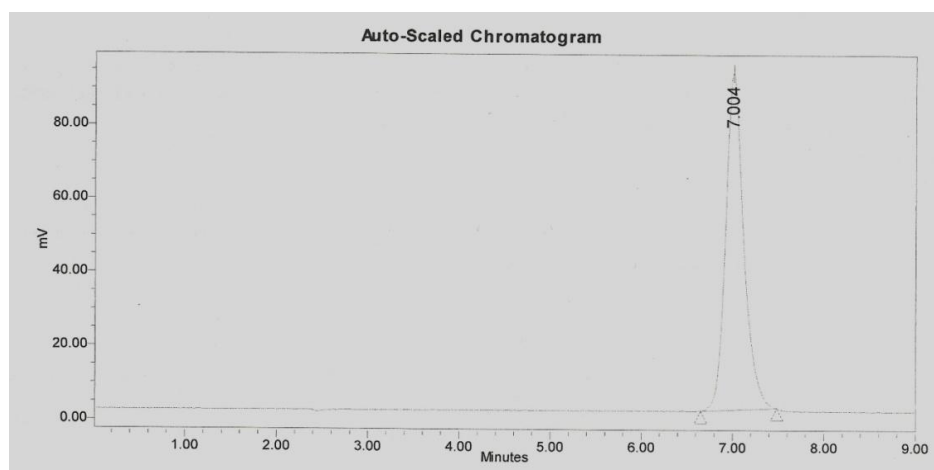


Fig. 2.- Cromatograma correspondiente a celecoxib (20 µg/ml).

Utilizando las condiciones de trabajo anteriormente indicadas se procedió a la validación del método analítico (ICH, 2005).

Linealidad

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la linealidad del método analítico.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico t	p-valor
Ordenada	157,8	4886,89	0,0323	0,9746
Pendiente	63675	322,086	197,697	0,0000

Tabla 1.- Resultados obtenidos del análisis de regresión múltiple.

ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente F	P- valor
Regresión	$4,62 \cdot 10^{12}$	1	$4,62 \cdot 10^{12}$	39084,21	0,0000
Residual	$1,89 \cdot 10^9$	16	$1,18 \cdot 10^8$		
Total	$4,62 \cdot 10^{12}$	17			

Coefficiente de correlación	0,9998
R-cuadrado	0,9996
R- cuadrado ajustado	0,9995
Error estándar	

Tabla 2.- Resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método de cuantificación de celecoxib por HPLC.

La pendiente resultó significativamente diferente de cero obteniéndose un valor de p menor de 0,05 (0,00) para un nivel de probabilidad del 95%. Además, la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero, ya que el p valor obtenido es mayor de 0,05 (0,97), para un nivel de probabilidad del 95%. Por tanto, el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,9998.

A modo de ejemplo, en la figura 3 se muestra la representación gráfica de una de las curvas de calibrado utilizada en el estudio estadístico de linealidad.

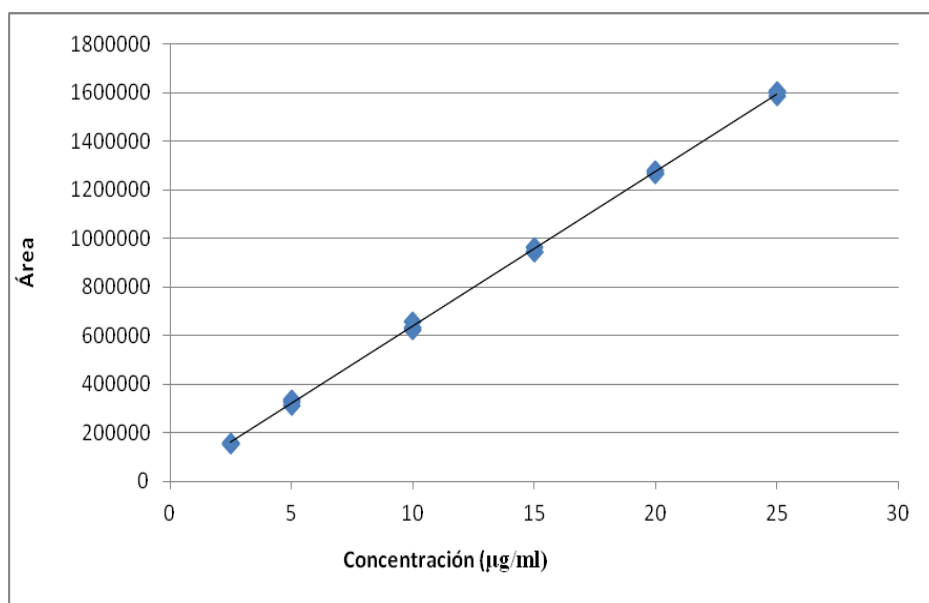


Fig. 3.- Recta de calibrado del celecoxib.

Exactitud

La exactitud muestra la capacidad de un método analítico para dar resultados más próximos al valor real. Para el cálculo de la exactitud, se determinaron los porcentajes de recuperación de CXB presentes en las muestras, de acuerdo al protocolo previamente establecido (apartado 3.1 de este capítulo).

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de exactitud.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	Desviación Típica	CV (%)
2,5	2,44	97,68	98,00	1,78	1,82
2,5	2,50	99,92			
2,5	2,41	96,41			
5	5,13	102,56	100,18	2,49	2,47
5	5,09	101,71			
5	4,89	97,89			
10	9,93	99,26	100,18	2,93	2,92
10	9,78	97,82			
10	10,35	103,46			
15	14,84	98,95	99,59	1,28	1,28
15	14,82	98,77			
15	15,16	101,07			
20	19,92	99,60	99,70	0,55	0,55
20	19,84	99,20			
20	20,06	100,29			
25	25,20	100,80	100,26	0,64	0,63
25	24,89	99,56			
25	25,11	100,42			

Tabla 3.- Resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método de cuantificación de CXB por HPLC.

Los resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método dan lugar a porcentajes de recuperación de CXB que oscilan entre 96,41% y 103,46%. Los valores de coeficiente de variación son inferiores a 2,95%, lo que permite considerar al método analítico como exacto para el análisis de CXB.

Precisión

La precisión expresa el grado de acercamiento (grado de dispersión) entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras. La precisión da idea de los errores aleatorios y se expresa mediante la medida de la repetibilidad y la reproducibilidad.

Los resultados obtenidos en los estudios de repetibilidad y reproducibilidad se muestran en las tablas 4 - 7.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	Desviación Típica	CV (%)
2,5	2,44	97,68	96,99	3,33	3,43
	2,50	99,92			
	2,53	93,37			
10	9,93	99,26	101,55	2,12	2,09
	10,35	103,46			
	10,19	101,92			
25	25,20	100,80	100,48	0,30	0,30
	25,11	100,42			
	25,05	100,21			

Tabla 4.- Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad correspondientes al día 1.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	Desviación Típica	CV (%)
2,5	2,39	95,63	100,20	3,97	3,96
	2,55	102,13			
	2,57	102,83			
10	10,04	100,41	100,83	1,89	1,87
	10,29	102,89			
	9,92	99,18			
25	24,94	99,76	99,59	0,60	0,60
	24,73	98,92			
	25,02	100,08			

Tabla 5.- Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad correspondientes al día 2.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	Media Recuperación (%)	Desviación Típica	CV (%)
2,5	2,41	96,41	97,88	3,46	3,54
	2,38	95,19			
	2,54	101,70			
10	9,62	92,21	98,64	2,18	2,21
	9,93	99,31			
	10,04	100,41			
25	25,25	100,60	100,14	0,44	0,44
	24,93	99,72			
	25,03	100,10			

Tabla 6.- Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad correspondientes al día 3.

Concentración (µg/mL)	CV interdía (%)			CV intradía (%) ^b
	Día 1 ^a	Día 2 ^a	Día 3 ^a	
2,5	3,43	3,96	3,46	3,49
10	2,09	1,87	2,18	2,21
25	0,3	0,6	0,44	0,56
a: analizados el mismo día (n=3)				
b: analizados en tres días consecutivos (n=9)				

Tabla 7.- Resultados obtenidos en el estudio de precisión.

Los resultados obtenidos en los estudios de repetibilidad nos muestran que los porcentajes de recuperación son próximos al 100% (93,3% - 103,46%). Los valores de coeficiente de variación obtenidos son inferiores al 4% en todos los casos. Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de la reproducibilidad son inferiores al 3,5%, lo que permite considerar al método de cuantificación de celecoxib por HPLC como preciso.

Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección calculado es de 0,015 µg/ml y el límite de cuantificación de 0,050 µg/ml.

Selectividad

Para evaluar la selectividad de la técnica analítica respecto a los excipientes se han valorado soluciones de microesferas blanco (n=3). Los cromatogramas obtenidos no mostraron ningún pico que pudiera interferir en la cuantificación de celecoxib.

4.2. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL CELECOXIB POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Se realiza un espectro de absorción del CXB en tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 3%, obteniéndose un máximo a 252,5 nm, longitud de onda utilizada para realizar la cuantificación del compuesto a partir de los ensayos de cesión *in vitro* de las microesferas y las nanopartículas.

Linealidad y exactitud

Para realizar los ensayos de linealidad se preparan 3 series de 8 patrones cada una, a partir de 3 pesadas distintas. Cada muestra es por tanto independiente del resto. Las series se realizan en tres días diferentes, estableciéndose 3 grupos.

En la tabla 8 se recogen los valores de absorbancia obtenidos para el estudio de linealidad.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,0391	0,0361	0,0378
2,5	0,1161	0,1087	0,1117
5	0,2237	0,2284	0,226
7,5	0,3411	0,3399	0,3305
10	0,4227	0,4534	0,4478
15	0,6389	0,6814	0,6626
20	0,8749	0,8979	0,8793
25	1,120	1,145	1,103

Tabla 8.- Absorbancias obtenidas en la valoración por espectrofotometría UV del celecoxib.

En la figura 4 se muestra la representación gráfica de la recta obtenida.

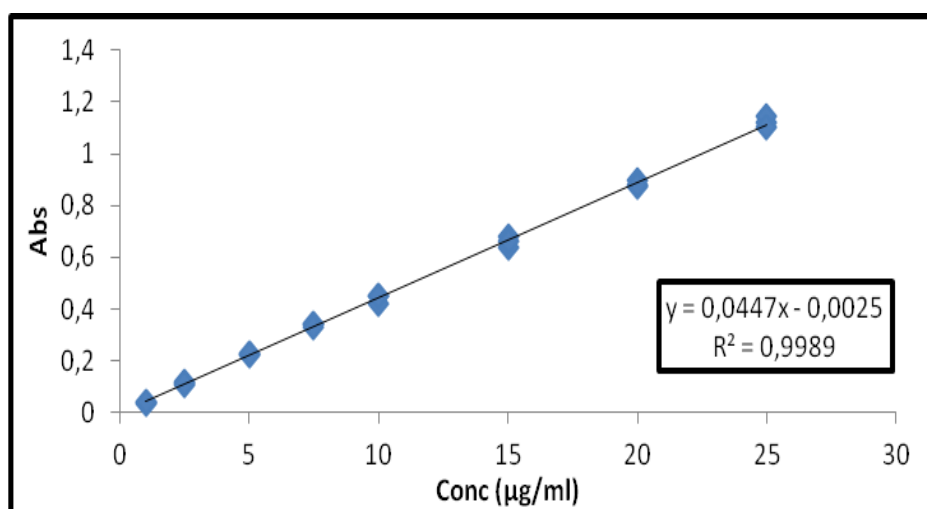


Fig. 4.- Recta de calibración obtenida.

En la tabla 9 se recogen los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIPLE					
Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico t	P- valor	
Ordenada	-0,002516	0,0042945	-0,585788	0,563979	
Pendiente	0,044673	0,000320	139,4873	6,4196E-34	
ANOVA					
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Valor Crítico de F
Regresión	1	3,0773	3,0773	19456,7114	6,4196E-34
Residual	22	0,003479	0,000158		
Total	23	3,0808			
Coeficiente de correlación			0,9994		
R-cuadrado			0,9989		
R-cuadrado ajustado			0,9988		
Error Estándar			0,0126		

Tabla 9.- Resultados del estudio de linealidad del método de cuantificación del CXB por espectrofotometría UV.

La F de Snedecor se obtiene gracias al ANOVA y nos permite analizar las variaciones debidas a la regresión frente a las debidas a los errores residuales (experimentales y de ajuste). La F obtenida es mayor que la F tabulada ($F_{\text{ratio}} > F(0,05;1; N-2)$), es decir, el valor crítico de $F < 0,05$, por lo que se acepta la existencia de una pendiente y por tanto, una dependencia lineal.

Los tests de proporcionalidad y regresión se llevan a cabo mediante un contraste de hipótesis. Si el valor obtenido para t es menor que la t tabulada (α ; $N - 1$), para un nivel de significación de 0,05 y grados de libertad de $N - 1$, se cumple la hipótesis nula (H_0). En cambio, si el valor obtenido para t es mayor que t tabulada (α ; $N - 1$), para un nivel de significación de 0,05 y grados de libertad de $N - 1$, es decir $p < 0,05$; se cumple la hipótesis alternativa. Por ello, se puede indicar que:

- Como el p-valor del análisis de regresión múltiple para la ordenada es 0,563979, mayor de 0,05, se cumple la hipótesis nula (H_0), lo que significa que la ordenada en el origen no es significativamente distinta de cero para un nivel de probabilidad del 95%. Es decir, la recta pasa por el punto (0,0).
- Como el p-valor del análisis de regresión múltiple para la pendiente es 6,4196E-34, menor de 0,05, se cumple la hipótesis alternativa (H_1), lo que significa que la pendiente es significativamente diferente de cero para un nivel de probabilidad del 95%. Es decir, la recta no es paralela al eje de abscisas, por lo que existe pendiente.

El ensayo de exactitud del método de cuantificación del CXB por espectrofotometría UV se ha llevado a cabo con los datos obtenidos para la determinación de la linealidad. Se calculan los porcentajes de recuperación del analito en cada muestra y los coeficientes de variación dentro de cada grupo.

En la tabla 10 se recogen los porcentajes medios de recuperación calculados.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	CV (%)
1	0,93	93,16	3,74
1	0,86	86,44	
1	0,95	95,25	
2,5	2,66	106,21	3,25
2,5	2,49	99,58	
2,5	2,56	102,27	
5	5,06	101,28	1,03
5	5,17	103,38	
5	5,12	102,31	
7,5	7,69	102,57	1,71
7,5	7,66	102,20	
7,5	7,45	99,39	
10	9,52	95,18	3,68
10	10,21	102,06	
10	10,08	100,80	
15	14,36	95,72	3,21
15	15,31	102,06	
15	14,89	99,26	
20	19,64	98,20	1,38
20	20,16	100,77	
20	19,74	98,70	
25	25,13	100,51	1,88
25	25,68	102,72	
25	24,74	98,94	

Tabla 10.- Resultados del estudio de exactitud del método de cuantificación del CXB por espectrofotometría UV.

Se obtienen porcentajes de recuperación de CXB en las muestras que oscilan entre 93,16% y 106,21%. Los coeficientes de variación

obtenidos son inferiores al 5%, lo que demuestra la exactitud del método.

Para el estudio de la precisión interdía se evalúan concentraciones repetidas de CXB. Se analizan, por triplicado, tres concentraciones (1; 7,5 y 25 µg/ml). Se calculan los porcentajes de recuperación del analito en las muestras, y sus respectivos coeficientes de variación.

Concentración Teórica (µg/ml)	Concentración Real (µg/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	CV (%)
1	0,93	93,16	3,74
1	0,86	86,44	
1	0,95	95,25	
7,5	7,69	102,57	1,71
7,5	7,66	102,20	
7,5	7,45	99,39	
25	25,13	100,51	1,88
25	25,68	102,72	
25	24,74	98,94	

Tabla 11.- Resultados del estudio de precisión.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los estudios de precisión demuestra que existe homogeneidad de varianzas entre los distintos grupos. Los coeficientes de variación obtenidos en el estudio de

precisión son inferiores al 5%, lo que permite considerar el método analítico como preciso.

La precisión se expresa mediante la medida de la repetibilidad y la reproducibilidad. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 12.

Concentración (µg/ml)	CV intradía (%)			CV interdía (%) ^(b)
	día 1 ^(a)	día 2 ^(a)	día 3 ^(a)	
1	1,62	1,77	1,98	2,13
5	1,12	1,43	1,67	1,82
10	0,94	0,73	0,51	1,11
^(a) Analizados en el mismo día (n=3).				
^(b) Analizados en tres días consecutivos (n=9).				

Tabla 12.- Resultados obtenidos en el estudio de precisión utilizando PBS con lauril sulfato sódico al 3% como medio de disolución.

Los coeficientes de variación obtenidos en los estudios de precisión fueron inferiores al 3%, lo que permite considerar el método analítico como preciso.

5. CONCLUSIONES

1. El método de cuantificación del celecoxib desarrollado por cromatografía líquida de alta resolución es lineal, exacto, preciso y selectivo.
2. El método de cuantificación del celecoxib desarrollado por espectrofotometría UV es lineal, exacto y preciso.

6. BIBLIOGRAFÍA

Baboata S., Faiyaz S., Ahuja A., Ali J., Shafiq S., Ahmad S. Development and validation of stability-indicating HPLC method for analysis of celecoxib (CXB) in bulk drug and microemulsion formulation. *Acta Chromatographica*, 18, pp.116-129, 2007.

Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Russoto R., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N`Guyen-Huu J.J. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission S.F.S.T.P. I. Méthodologie. *STP Pharma Pratiques*, 4: 205-226, 1992a.

Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Russoto R., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N`Guyen-Huu J.J. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission S.F.S.T.P. II. Exemples d'application. *STP Pharma Pratiques*, 4: 227-239, 1992b.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline Q2B R1: Validation of Analytical procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland. 2005.

*III- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB
EN CULTIVOS CELULARES*

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivos celulares constituyen, hoy en día, una de las herramientas más utilizadas para la evaluación de la actividad de los fármacos. Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células que provienen de un órgano o un tejido, normal o tumoral, y que son mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera similar a las que tenían en el huésped.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de cultivo primario. Si el cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren una capacidad de multiplicación ilimitada, recibe el nombre de Línea Celular. Los cultivos de células animales también se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada, pudiendo crecer en forma de monocapa o en suspensión.

Los cultivos primarios conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y se produce inhibición por contacto. Como morfológicamente están más cercanas a las células que las originaron, esto se verá reflejado en una mejor actividad y funcionalidad del cultivo (*Freshney, 2006*).

En el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos, tales como las formulaciones de micropartículas y nanopartículas de CXB que se elaboran en esta memoria, las técnicas de cultivos celulares constituyen una de las herramientas utilizadas para la evaluación de la actividad del fármaco. Con estas técnicas podemos someter a las células a concentraciones definidas de principio activo, lo que permite determinar de forma independiente y selectiva las concentraciones de fármaco capaces de producir el efecto deseado; por ejemplo un efecto antiproliferativo (*Lehr, 2002; Allen y col., 2005*).

La muerte celular puede adoptar dos patrones diferentes tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico. Se produce necrosis como resultado de la acción de un agente nocivo, como puede ser una isquemia prolongada, agentes químicos y físicos, etc. Se observa sólo en condiciones patológicas, afectando a un gran número de células, sin que el proceso requiera de un aporte de energía. Este tipo de muerte celular ocasiona un importante edema celular, con pérdida de la integridad de la membrana plasmática y posterior vertido del contenido intracitoplasmático al espacio extracelular, hecho que determina una reacción inflamatoria, que a su vez aumenta el daño tisular (*Cotran y col., 2000*).

En la apoptosis la célula es parte activa en su propia muerte. Es un proceso observable tanto en condiciones fisiológicas (embriogénesis, durante el desarrollo del tejido linfoide, etc.) como patológicas (enfermedades neurodegenerativas, SIDA, cáncer), afectando tanto a células aisladas como a grupos de células. El proceso se desarrolla de forma activa, ya que requiere de energía, en forma de ATP y en algunos casos de expresión génica (*Reed, 2000*).

En el proceso apoptótico se producen cambios celulares resultantes de la activación de un grupo de proenzimas citoplasmáticas denominadas caspasas (cisteinproteasas) (*Green y col., 2002*). Las caspasas son las responsables de cambios tales como: retracción celular, protrusiones citoplasmáticas de diversos tamaños, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y segmentación nuclear, que dan como resultado final la formación de cuerpos apoptóticos por fragmentación de la célula. Dichos cuerpos se hallan rodeados por una membrana plasmática que impide la salida del contenido citoplasmático al espacio extracelular, evitando así una reacción inflamatoria que sería perjudicial (*Spinelli y col., 1997; Cotran y col., 2000; Green y Evan., 2002; Goya y col., 2003*).

Cabe destacar que las mismas causas que provocan necrosis pueden conducir también a apoptosis cuando actúan a dosis o concentraciones subletales, permitiendo así el desarrollo de diferentes modelos experimentales no sólo *in vivo* sino también *in vitro* para su estudio (*Goya y col., 2003*).

La apoptosis tiene una doble importancia en oncología; por un lado, su desregulación interviene en la génesis del cáncer y por otro, estas mismas alteraciones hacen resistentes a las células tumorales al tratamiento radioterápico y quimioterápico.

Estudios recientes han empleado el CXB para explorar el potencial quimiopreventivo de este fármaco en diferentes neoplasias tales como: cáncer colorrectal, de pulmón, de próstata y de mama. Asimismo, se está investigando el posible efecto de ese agente en la prevención de recidivas y de segundas neoplasias en pacientes con

tumores cerebrales (*Harris y col., 2000; Simone y col., 2004; Pruthi y col., 2004*).

Por este motivo en este capítulo hemos estudiado el efecto antiproliferativo del CXB en diferentes líneas celulares de cáncer: PC12, SKN-AS y U373-MG.

2. OBJETIVO

El objetivo general de este estudio es evaluar la actividad antiproliferativa del CXB en diferentes líneas celulares continuas que derivan de tumores y determinar las concentraciones eficaces del mismo para conseguir una reducción de la viabilidad celular adecuada para la politerapia en tumores cerebrales.

Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la actividad antiproliferativa del CXB sobre la línea celular PC12 de feocromocitoma. Se evaluará si la actividad antiproliferativa es dosis- y/o tiempo-dependiente.
2. Determinar la concentración eficaz de CXB para el 50% de viabilidad celular (EC50) sobre la línea celular SKN-AS procedente de tumor cerebral humano (neuroblastoma).

3. Determinar la concentración eficaz de CXB para el 50% de viabilidad celular (EC50) sobre la línea celular U373-MG procedente de tumor cerebral humano (glioblastoma).

3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Todos los ensayos han sido realizados en la Unidad de Cultivos de Células Animales de la Universidad de Alcalá (Alcalá de Henares).

3.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LA LÍNEA CELULAR PC12

La línea celular PC12 es una línea de origen tumoral procedente de feocromocitoma de rata; que es un tumor de las cápsulas suprarrenales. Las células PC12 detienen su división y experimentan una diferenciación terminal cuando se tratan con el factor de crecimiento nervioso, lo que hace que esta línea sea un modelo útil para la diferenciación de células nerviosas (*Greene y Tischler, 1976; Guroff, 1985*).

Esta línea celular ha sido obtenida del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se cultivan bajo condiciones normales (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) en ambiente húmedo a 37° C, empleando como medio de cultivo RPMI 1640 + 10% HS (horse serum inactivado por calor) + 5% FBS (suero fetal bovino) + 10% antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B) (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK).

Las células se mantienen en cultivo y cuando se encuentran al 80-100% de confluencia, se levantan, se centrifugan, se retira el sobrenadante y se ajustan a la concentración deseada.

En nuestro estudio se evalúa la influencia de la concentración y del tiempo de exposición del fármaco a los cultivos. Para ello, se siembran placas de seis pocillos con 300.000 células/pocillo, se añaden las diferentes concentraciones de CXB: 25, 50, 80, 100, 200, 400, 600 y 800 μ M en RPMI a cada uno de los pocillos y se incuban las células durante 24, 48 y 72h.

- **Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo**

Para la determinación de la viabilidad se emplea la técnica de citometría de flujo. Esta técnica se basa en hacer pasar las células de forma individual por un haz de luz generado por un láser. La interacción producida da lugar a la transmisión, dispersión y emisión de dicha luz, que es recogida por un detector y gracias a ello es posible diferenciar distintas poblaciones celulares inducidas en las muestras: células vivas, células muertas y restos celulares (debris).

Para realizar el ensayo de viabilidad celular, se levantan las células mediante tripsina y se añaden a tubos de citometría que se centrifugan a 1300 r.p.m durante 5 minutos. Se resuspenden las células con 500 μ l de PBS. Se toman 200 μ l de la suspensión de células, 100 μ l de PBS y 10 μ l de IP (ioduro de propidio). Se agitan los tubos y se pasan

por el citómetro. Se determina la viabilidad excitando con el láser de Argón (488 nm) y recogiendo la señal en FL2 (585/42 nm).

Los resultados obtenidos se expresan como viabilidad celular: células vivas (%), células muertas (%) y debris (%) con respecto al control.

- **Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo**

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha evaluado por citometría de flujo midiendo el aumento de la fluorescencia del marcador DCFH-DA (acetato de diclorodihidrofluoresceína). Esta técnica es una de las más utilizadas para medir el estado Redox de las células (*Eruslanov y Kusmartsev, 2010*).

Las estearasas intracelulares se unen al DCFH-DA en los dos enlaces éster dando lugar a un compuesto relativamente polar H₂DCF, que no presenta fluorescencia pero que, tras acumularse intracelularmente, sufre oxidación, dando lugar a un compuesto con elevada fluorescencia (DCF). El estado Redox de las células se puede determinar por tanto, mediante el incremento de la fluorescencia, que es proporcional a la concentración de ROS en las células (*Royall y Ischiropoulos, 1993; Eruslanov y Kusmartsev, 2010*).

La incubación de las células con las diferentes concentraciones de CXB (25-800 µM) se ha realizado utilizando el protocolo indicado anteriormente.

Para la determinación de la fluorescencia, una vez incubadas las células (placas de 6 pocillos con 300.000 células/pocillo), se levantan, se retira el sobrenadante y se resuspende en 300 µl de PBS en los pocillos. Posteriormente, las células se incuban durante 30 minutos a 37° C en oscuridad. Finalmente, se mide la fluorescencia mediante la utilización de una sonda FL1 (530/30 nm) y utilizando como longitud de onda de excitación 488 nm.

Los resultados obtenidos se expresan como intensidad de fluorescencia.

3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LAS LÍNEAS CELULARES SKN-AS Y U373-MG

La línea celular SKN-AS (ATCC, Manassaa, VA, USA) proviene de neuroblastoma infantil humano. Se trata de una línea en la que el gen MYCN no está amplificado mientras que hay niveles elevados de expresión del gen MYC (*Ikegaki y col., 2011*). La amplificación del oncogen MYCN está directamente relacionada con un mal pronóstico de la enfermedad (*Yoshimoto y col., 1999*). Por lo que se refiere al gen MYC, se encuentra localizado en el cromosoma 8 y parece que regula la expresión del 15% de todos los genes (*Gearhart y col., 2007*). La sobreexpresión del gen MYC está implicada en la etiología de diversos tumores (*Cole, 1986*).

Por lo que se refiere a la línea celular U373-MG (ATCC, Manassaa, VA, USA) procede de un astrocitoma humano y se

caracteriza porque contiene células GFAP-positivas (células de teína gliofibrilar ácida). Se trata de una línea que expresa receptores H_1 de histamina pero no los H_2 o H_3 (Hernández-Ángeles y col., 2001). Los gliomas, en particular los de origen astrocítico, son los tumores primarios cerebrales más comunes (Kleihues y col., 1995). Los receptores H_1 , expresados en esta línea celular, presentan características similares de unión a los receptores que existen en el cerebro de mamíferos (Arias-Montaña y col., 1994), por lo que es una línea muy útil como modelo celular para el estudio de las funciones astrocíticas mediadas por la activación de receptores H_1 , tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Se ha demostrado que en esta línea celular, la activación de los receptores H_1 resulta en un aumento de la proliferación celular, hecho que parece estar parcialmente relacionado con estimulación de la proteína quinasa C (PKC) y activación de proteína quinasas tipo MAPK (protein-quinasas mitogen activadas) (Hernández-Ángeles y col., 2001).

El crecimiento de ambas líneas celulares se realiza a 37 °C en presencia de una atmósfera de CO_2 al 5% y un 95% de aire, en un medio de crecimiento que contiene DMEM, suero fetal bovino (10%) y un 10% de una mezcla antibiótico-antimicótico (penicilina/streptomicina /anfotericina B). Las células se mantienen en cultivo renovándose el medio de cultivo tres veces por semana. El día del experimento, cuando las células se encuentran al 80-100% de confluencia, se retira el medio de cultivo y se procede a la separación de las células mediante la utilización de tripsina, y se ajustan a la concentración deseada. A continuación se siembran placas de seis pocillos con 300.000 células/pocillo y se ponen en contacto con diferentes concentraciones de CXB, obtenidas de los ensayos de cesión a partir de las microesferas y

durante las primeras 48 horas del ensayo *in vitro*. Las muestras obtenidas a cada uno de los tiempos ensayados, se mezclan y se cuantifican por espectrofotometría UV; se añade 500 µl de DMSO y se realizan las diluciones adecuadas para posteriormente añadir sobre el cultivo celular. Las concentraciones obtenidas a los distintos tiempos de muestreo fueron: 62,5; 79,5; 99,3 y 118,3 µM. Los cultivos se mantienen en incubación durante 48 horas.

- **Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo**

Una vez incubadas, se procede a levantar las células y se pasan a tubos de citometría. Se centrifugan a 1300 rpm durante 5 minutos y se resuspenden en 250 µl de PBS. Se añaden 100 µl de PBS + 10 µl de IP (ioduro de propidio). Se agitan los tubos y se pasan por el citómetro. La viabilidad se obtiene excitando con el láser de Argón (488 nm) y recogiendo la señal en FL2 (585/42 nm). Obtenemos de esta forma, una población de células vivas (no tienen señal fluorescente, ya que no atrapan el IP) y una población de células no viables (fluorescentes, por captar el IP). Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de células vivas.

- **Cálculo de la concentración efectiva 50% (EC 50)**

La concentración efectiva 50 (EC 50), es la necesaria para reducir la viabilidad celular al 50%. Para realizar el cálculo se ajusta la curva de concentración-respuesta a una regresión no lineal cuadrática de

acuerdo a la siguiente expresión: $y = ax^2 + bx + c$, utilizando para ello el programa informático Statgraphics 5.1 (StatPoint Technologies, Inc., USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LA LÍNEA CELULAR PC12

En la figura 5 se recogen los resultados de viabilidad celular obtenidos cuando se incuban las células PC12 con diferentes concentraciones de CXB durante 24, 48 y 72h.

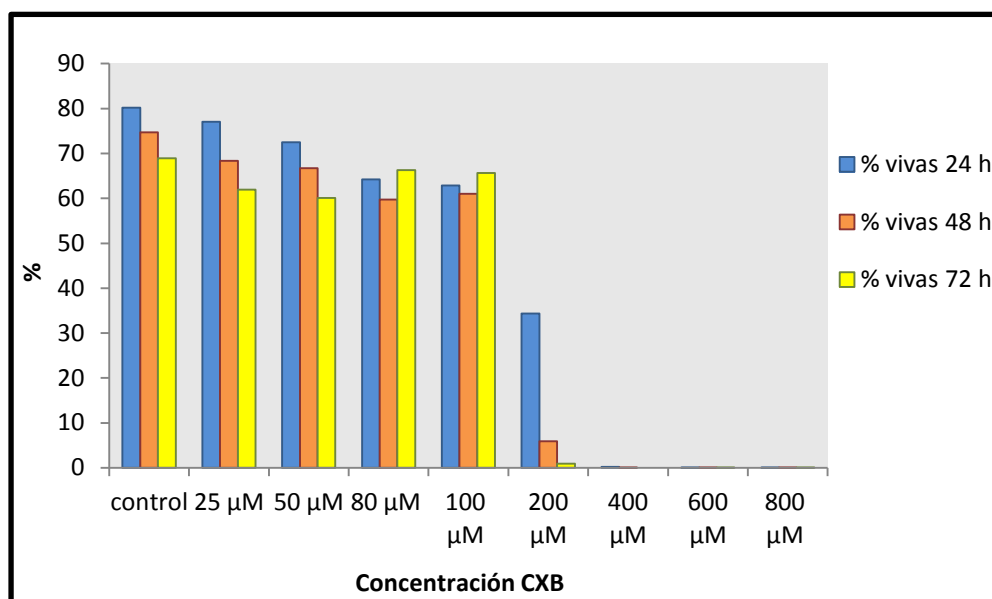


Fig. 5.- Porcentaje de células vivas (PC12) obtenidas para las concentraciones de CXB ensayadas (25-800 µM) tras 24, 48 y 72 horas de incubación.

Tras 24 y 48 horas de incubación los resultados obtenidos muestran un descenso en la viabilidad celular de las células PC12 en presencia de concentraciones crecientes de CXB (25-800 μM). Por tanto, podemos indicar que se observa un descenso en la viabilidad celular que es dosis-dependiente. Este efecto se hace más evidente para la concentración de 200 μM , que presenta un porcentaje de viabilidad celular del 34% tras 24 horas de incubación y de tan sólo un 7% tras 48 horas de incubación.

Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos tras 72 horas, no muestran una clara influencia del tiempo de exposición al fármaco cuando se analizan concentraciones superiores a 50 μM . Cuando se observan los valores de viabilidad celular correspondientes a las concentraciones de 100 μM y 200 μM , el porcentaje de células vivas es ligeramente superior al obtenido para la concentración de 50 μM . A partir de 200 μM , el porcentaje de células vivas es prácticamente nulo. En resumen, únicamente se observa la influencia del tiempo de exposición a concentraciones bajas, apareciendo una muerte celular muy elevada cuando las concentraciones son muy elevadas ($\geq 200 \mu\text{M}$).

Es necesario indicar que este descenso de células vivas va acompañado, como es lógico, con un aumento en las células que sufren muerte por necrosis y/o apoptosis. La técnica empleada nos permite diferenciar ambas poblaciones, ya que no contabiliza únicamente las células vivas (Figura 6).

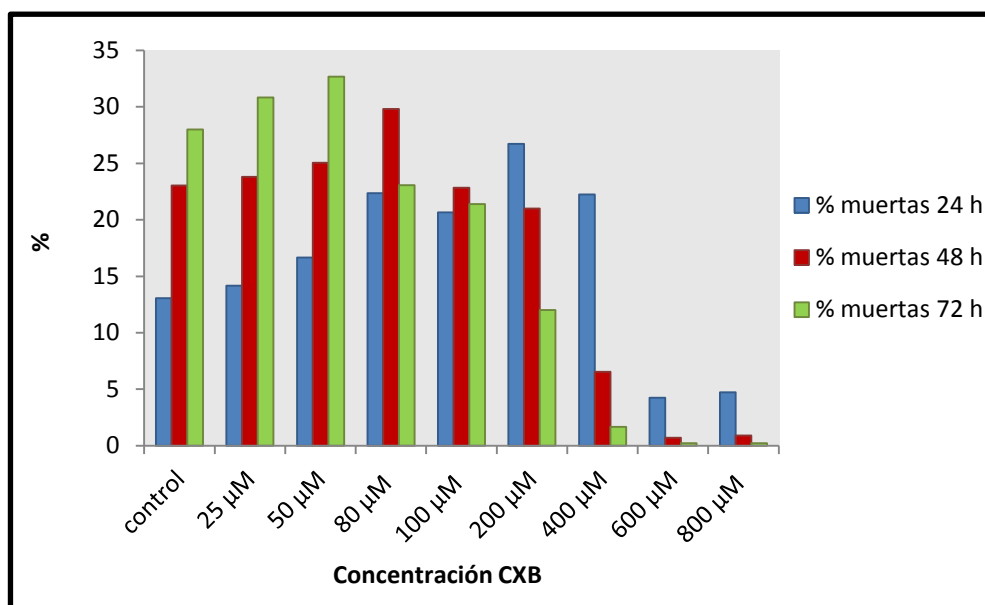


Fig. 6.- Porcentajes de células muertas (PC12) obtenidos para las concentraciones de CXB ensayadas (25-800 µM) tras 24, 48 y 72 horas de incubación.

En nuestro caso, el descenso en la viabilidad celular es dosis-dependiente y, a partir de la concentración de 200 µM, el porcentaje de células vivas es muy bajo. Sin embargo, estos resultados no resultan adecuados a nuestros objetivos, ya que, junto a una mayor muerte celular aparece un fenómeno llamado *debris*. Este fenómeno implica la aparición de restos o residuos celulares debidos a la destrucción de las células. La aparición de este fenómeno, en un porcentaje elevado, se debe a un incremento en el porcentaje de muerte celular debida a necrosis o a una apoptosis tardía, en la que los restos o cuerpos apoptóticos están rodeados por una membrana y son fagocitados por las células.

En la figura 7 se muestra como los porcentajes de *debris* obtenidos son muy elevados a partir de la concentración de 200 μM , mientras que a concentraciones inferiores son prácticamente no significativos.

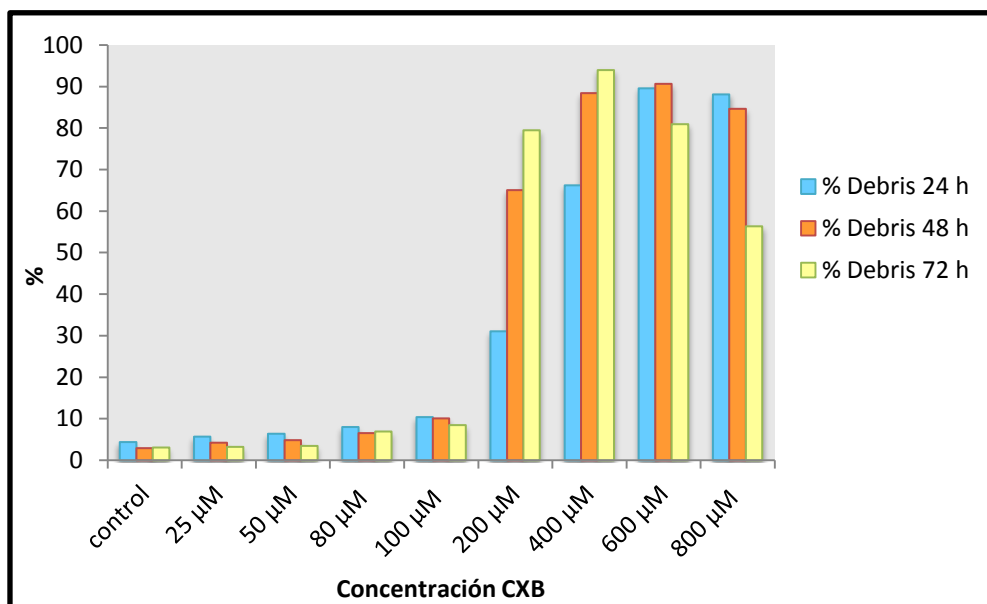


Fig. 7.- Porcentajes de debris obtenidos en células PC12 para las concentraciones de CXB ensayadas (25-800 μM) tras 24, 48 y 72 horas de incubación.

A la vista de los resultados obtenidos podemos indicar que con las concentraciones ensayadas de CXB se ha observado una clara disminución en la viabilidad celular, lo que nos indica un efecto antiproliferativo del compuesto sobre las células PC12. CXB es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima que juega un papel fundamental en el desarrollo y proliferación de tumores (Subbaramaiah y col., 1996; Greenhough y col., 2009). Diversos

estudios han puesto de manifiesto que CXB puede actuar sobre diferentes mecanismos enzimáticos y celulares, además de su efecto sobre la COX-2. Así, es capaz de inhibir anhidrasas carbónicas (Weber y col., 2004) y los canales de Na⁺ en neuronas aisladas de retina (Frolov y col., 2008). Además, estudios realizados por Zhang y col. (Zhang y col., 2007) en células PC12 han demostrado que CXB inhibe los canales de calcio tipo L mediante un mecanismo independiente de la COX-2, que puede ser el responsable de su efecto como antitumoral.

En las figuras 8 a 11 se muestran imágenes de las células PC12 tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de celecoxib (25, 50, 100 y 200 μ M) y obtenidas mediante microscopía laser confocal.

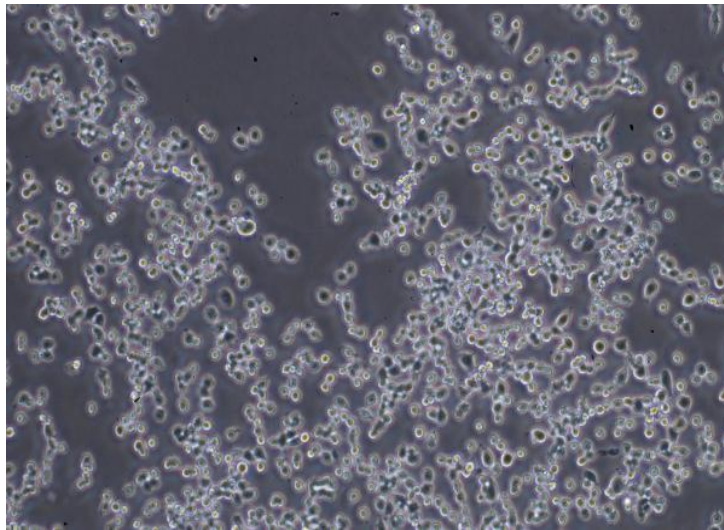


Fig. 8.- Células PC12 con una concentración de celecoxib de 25 μ M.

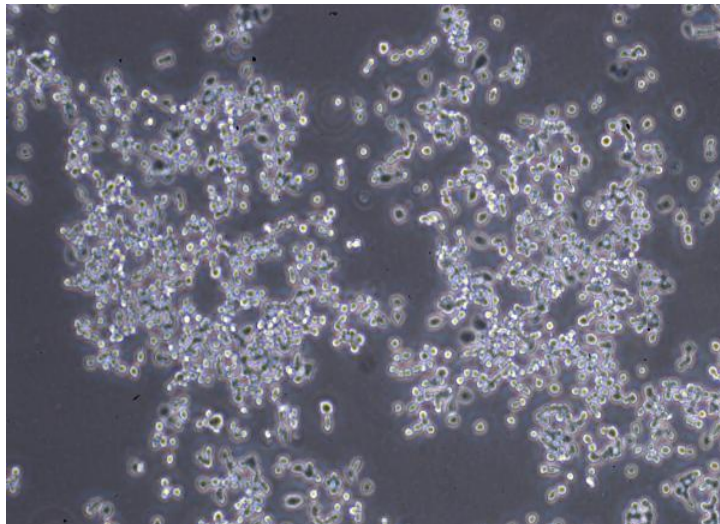


Fig. 9.- Células PC12 con una concentración de celecoxib de 50 μM .

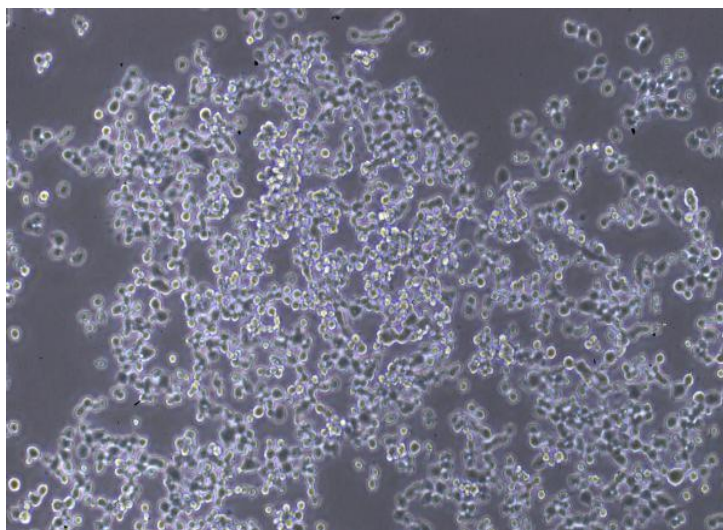


Fig. 10.- Células PC12 con una concentración de celecoxib de 100 μM .

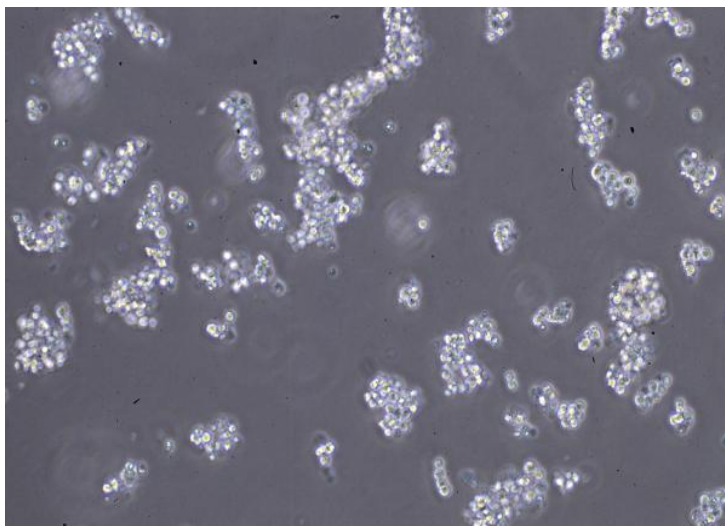


Fig. 11.- Células PC12 con una concentración de celecoxib de 200 μM .

Bajo la denominación de ROS (especies reactivas de oxígeno) se incluye a una serie de moléculas reactivas y radicales libres, que derivan del oxígeno molecular, y que se forman como bioproductos en la respiración aeróbica o a partir de reacciones de oxidación y óxido-reducción. Son ROS el H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), el NO (óxido nítrico), O_2^- (anión óxido), peroxinitrito (ONOO^-), el ácido hidroclicloro (HOCl), y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Estudios recientes han puesto de manifiesto la influencia de la producción de ROS en procesos de señalización celular, incluyendo apoptosis, expresión de genes y activación cascadas celulares, de manera que los productos ROS pueden actuar como mensajeros tanto intra como extra-celulares (*Hancock y col., 2001*).

Ante la aparición de ROS, como consecuencia de una situación de estrés, la respuesta típica es suspender el ciclo celular y entrar en la

fase G0, de manera que si continúa la exposición y/o hay niveles elevados de ROS, se desencadenan los mecanismos que conducen a apoptosis (*Kops y col., 2002*). En condiciones normales, las especies reactivas de oxígeno son eliminadas de las células mediante la acción de enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa o glutatión peroxidasa (GSH). La producción de ROS es la causa más frecuentemente involucrada en la mayoría de las alteraciones degenerativas ocurridas en células eucariotas. Así, los radicales libres pueden ocasionar fragmentación del ADN, alteración en los procesos de entrecruzamiento de proteínas e incluso oxidación de lípidos (*McKersie y col., 1996; Burhans y Heintz, 2009*).

En la figura 12 se muestran los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos para las diferentes concentraciones de CXB, y representativos de la producción de ROS. Un aumento en la fluorescencia indica una mayor muerte celular. Tras 24 horas de incubación con las concentraciones de CXB de 25 a 100 μM , se observa un aumento de la fluorescencia, lo que significa que la cantidad de ROS aumenta según se incrementa la concentración de CXB. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para la viabilidad celular, observándose una relación dosis-dependiente.

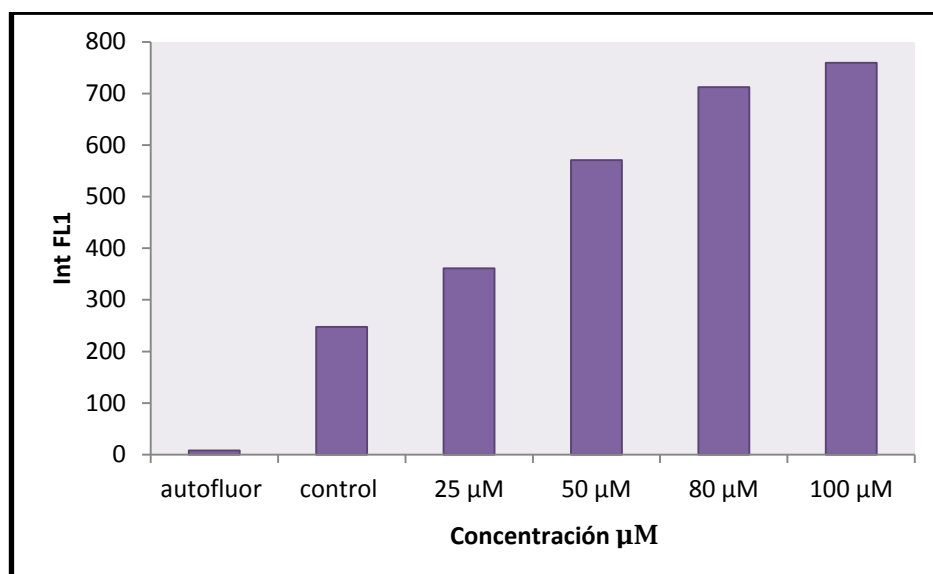


Fig. 12.- Resultados medios de intensidad de fluorescencia (producción de ROS) obtenidos en células PC12 tras incubación durante 24 horas con distintas concentraciones de celecoxib (25, 50, 80 y 100 μM).

El estrés oxidativo es un potente inductor de la transcripción del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) (Schäfer y col., 2003), que interactúa estrechamente con la COX-2 en la neoangiogénesis que a su vez soporta la carcinogénesis. Es un mutágeno capaz de dañar el ADN celular al tiempo que las proteínas responsables de su reparación, y por tanto el propio proceso inflamatorio puede actuar como iniciador del cáncer a través de los radicales libres de oxígeno y de óxido nítrico que genera. Por este hemos realizado la determinación de la producción de ROS en la línea celular PC12.

El origen de esta línea celular, así como su utilización como modelo de células de cerebro, nos permite investigar con otras líneas

celulares más específicas para nuestros objetivos, provenientes de tumores cerebrales humanos: una como representativa de tumor cerebral primario (células U3T3-MG) y otra como metastásico (SKN-AS).

4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL CELECOXIB EN LAS LÍNEAS CELULARES SKN-AS Y U373-MG

A partir de los resultados obtenidos en la línea celular PC12, se amplía el estudio sobre líneas celulares procedentes de tumores cerebrales (SKN-AS y U373-MG), con el fin de evaluar en las mismas el efecto antiproliferativo de distintas concentraciones de CXB, mediante la determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo.

En el caso de la línea celular SKN-AS, las células se ponen en contacto con diferentes concentraciones de CXB obtenidas durante los ensayos de cesión a partir de las microesferas. La muestra se cuantifica, se añade 500 μ l de DMSO y se realizan las diluciones adecuadas para posteriormente añadir sobre el cultivo celular. Se ensayan diferentes concentraciones obtenidas a distintos tiempos de muestreo: 62,5; 79,5; 99,3 y 118,3 μ M. En la figura 13 se recogen los resultados de viabilidad celular obtenidos.

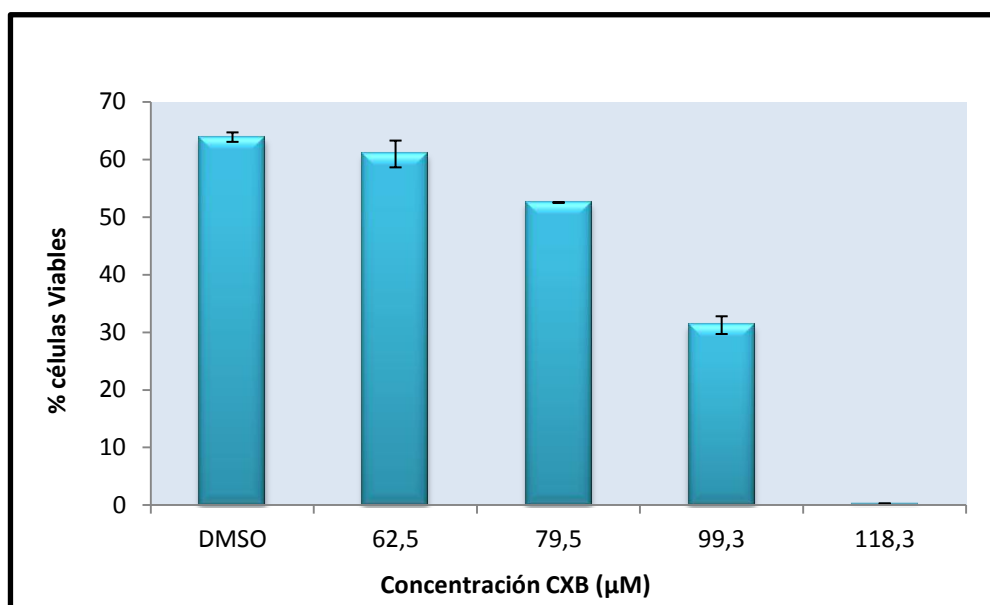


Fig. 13.- Porcentajes de células vivas (SKN-AS) obtenidos para las concentraciones de celecoxib ensayadas.

Los datos muestran una clara disminución en la viabilidad celular de las células SKN-AS a medida que aumenta la concentración de CXB, obteniéndose por tanto una muerte celular que es dosis-dependiente.

Con los datos obtenidos de concentración-respuesta, se realiza un ajuste a diferentes ecuaciones matemáticas, con el fin de calcular la concentración efectiva 50 (EC50), concentración necesaria para reducir la viabilidad celular al 50%. Los datos obtenidos se ajustan a una regresión no lineal cuadrática de acuerdo a la siguiente expresión (figura 14):

$$y = -0,015 x^2 + 1,622 x + 18,19 \quad (r^2 = 1)$$

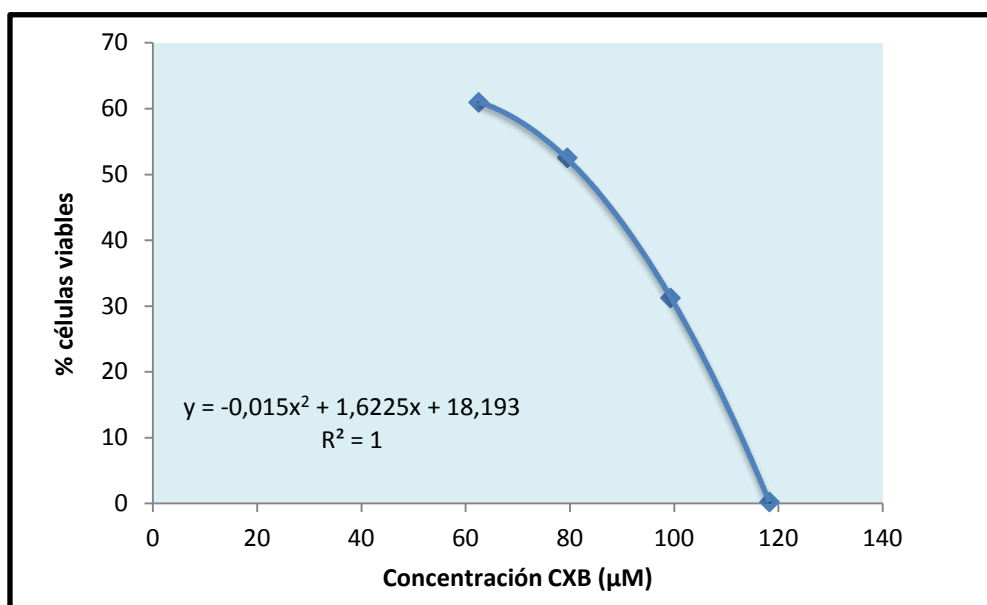


Fig. 14.- Resultados de viabilidad celular obtenidos para la línea SKN-AS y ajustados a una ecuación polimérica cuadrática.

A partir de la expresión matemática podemos calcular la concentración eficaz de CXB para el 50% de viabilidad celular, y que corresponde a $EC_{50} = 82,4 \mu\text{M}$.

El glioblastoma es el tumor cerebral primario más frecuente, por este motivo se realizan estudios sobre células cancerígenas humanas de glioblastoma con el fin de evaluar su actividad antiproliferativa. Para llevar a cabo los estudios, se han utilizado como modelo celular la línea celular U373-MG. De igual manera que con la línea celular SKN-AS, se ponen en contacto con las células diferentes concentraciones de CXB, obtenidas durante los ensayos de cesión de las microesferas. Se ensayan diferentes concentraciones obtenidas a distintos tiempos de muestreo: 62,5; 79,5; 99,3 y 118,3 μM . En la figura 15, se muestran los resultados

de viabilidad celular obtenidos para las diferentes concentraciones de CXB ensayadas.

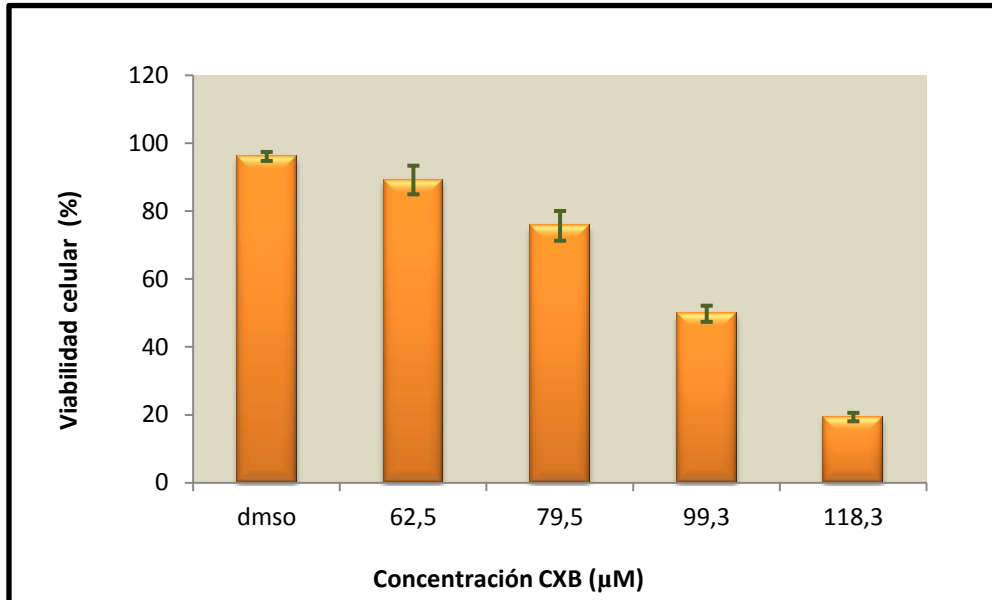


Fig. 15.- Porcentajes de células vivas (U373-MG) obtenidos para las concentraciones de celecoxib ensayadas.

Los resultados obtenidos muestran una relación dosis-dependiente entre la concentración de CXB y la viabilidad celular. Al analizar los datos podemos indicar que también en este caso observamos una actividad antiproliferativa significativa del CXB sobre la línea celular U373-MG en el rango de concentraciones ensayadas.

Cuando se realiza el ajuste a una regresión no lineal cuadrática se obtiene la siguiente ecuación (figura 16):

$$y = -0,010 x^2 + 0,646 x + 90,27 \quad (r^2 = 0,999)$$

A partir de la expresión matemática podemos calcular la concentración eficaz de CXB para el 50% de viabilidad celular y que tiene un valor de $EC_{50} = 99,81 \mu M$.

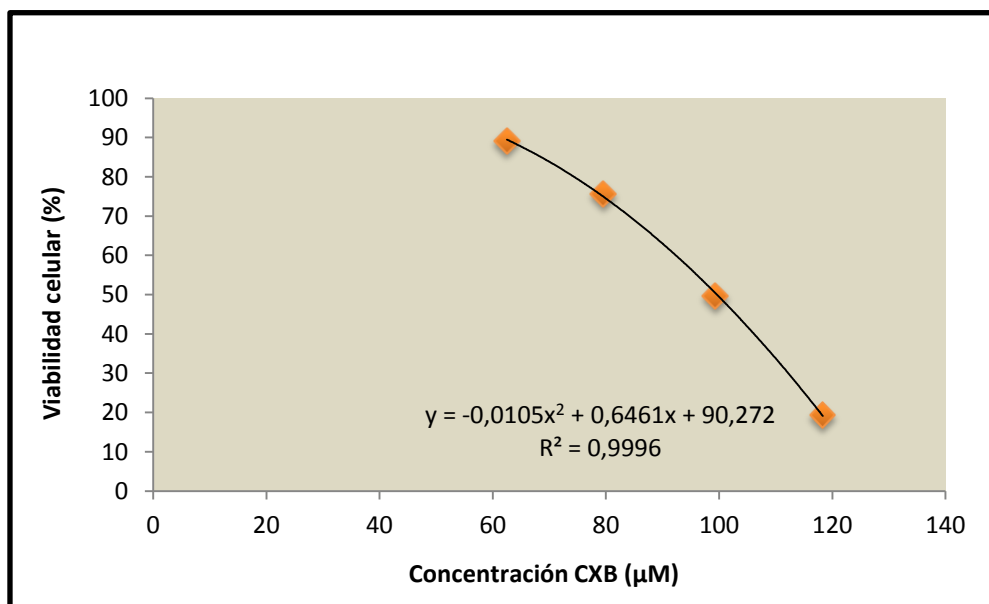


Fig. 16.- Resultados obtenidos de viabilidad celular en la línea celular U373-MG ajustados a una ecuación polimérica cuadrática.

Al comparar los valores de EC_{50} obtenidos en ambas líneas celulares se obtiene un valor ligeramente superior en las células U373-MG ($99,81 \mu M$) con respecto a las SKN-AS ($82,4 \mu M$).

Los estudios realizados sobre líneas celulares con AINEs muestran una disminución de la síntesis de PG junto con una reducción dosis-tiempo dependiente en la proliferación celular e inducción de apoptosis. Numerosos estudios han demostrado que la COX-2 y sus prostanoïdes aumentan la resistencia celular a la muerte por apoptosis.

El presente estudio demuestra que CXB es capaz de inhibir la proliferación de células U373-MG y SKN-AS. En la mayoría de los estudios publicados el efecto antiproliferativo de CXB está asociado con la producción de apoptosis, en el rango de concentraciones de 40 a 100 μ M (*Grosch y col., 2001; Liu y col., 2003; Nam y col., 2004*).

El tratamiento recomendado para el glioblastoma consiste en la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia. Estudios llevados a cabo por Ma y col. (*Ma y col., 2011*) empleando células CD133 de glioblastoma humano, concluyen que el empleo de CXB combinado con radiación juega un papel crítico en la supresión del crecimiento de CD133 (+) células de glioblastoma stem-like. Estos autores indican que la presencia del CXB mejora la terapia de las radiaciones debido a que posee un efecto radiosensibilizador, Kuipers y col. (*Kuipers y col., 2007*) han indicado que existe una correlación entre niveles endógenos de COX-2 y la aparición de resistencia a la radioterapia en células de glioma U87, y que CXB es capaz de incrementar el efecto antiangiogénico y radiosensibilizador de la radioterapia, en el tratamiento del glioblastoma.

En consecuencia, los efectos antiinflamatorio, antiproliferativo y radiosensibilizador del CXB, le convierten en un candidato idóneo para el desarrollo de vectores micro y nanoparticulados.

5. CONCLUSIONES

1. El CXB inhibe la proliferación de células PC12, SKN-AS y U373-MG en el rango de concentraciones estudiadas, probablemente debido a la inhibición de COX-2.
2. Teniendo en cuenta que se trata de un antiinflamatorio eficaz, con efecto radiosensibilizador que favorece la eficacia de la radioterapia tras la resección del tumor, y que además presenta un efecto antiproliferativo sobre células de glioma, el CXB resulta un candidato adecuado para nuestros objetivos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Allen D.D., Caviedes R., Cárdenas A.M., Shimahara T., Segura-Aguilar J., Caviedes P.A. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31(8):757-768, 2005.

Arias-Montaña J.A., Berger V., Young J.M. Histamine- and carbachol-induced inositol phosphate formation in human U373 MG cells: receptor characteristics and Ca^{2+} dependence. *Br. J. Pharmacol.*, 111: 598-608, 1994.

Burhans W., Heintz N. The cell cycle is a redox cCycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Rad. Biol. Med.*, 47:1282-1294, 2009.

Cole M.D. The MYC oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet.*, 20: 361–384, 1986.

Cotran R.S., Kumar V., Collins, T. Patología Celular 1: Lesión y Muerte Celulares. *Patología Estructural y Funcional.*, 1:1-31, 2000.

Eruslanov E., Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. En: D. Armstrong, ed. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New Jersey, 2010.

Freshney R.I. Basic principles of cell culture. En: Vunjak-Novakovic G. y Freshney R.I., eds. Culture of Cells for Tissue Engineering. John Wiley & Sons, Inc, New York, 2006.

Frolov R.V., Slaughter M.M., Singh S. Effects of celecoxib on ionic currents and spontaneous firing in rat retinal neurons. *Neurosci.*, 154: 1525-1532, 2008.

Gearhart J., Pashos E.E., Prasad M.K. Pluripotency redux: Advances in stem-cell research. *N. Engl. J. Med.*, 357:1469-1472, 2007.

Goya R.G., Cónsole G.M., Spinelli O.M., Carino M.H., Riccillo F., Corrons F.J. Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoid organs is associated with a delayed increase in circulating deoxyribonucleic acid. *Apoptosis*, 8: 171-177. 2003.

Green D.R., Evan G.I. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1:19-30. 2002.

Greene L.A., Tischler A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (sympathetic neurons/cell culture/catecholamines/ differentiation/ neurites). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(7): 2424-2428, 1976.

Greenhough A., Smartt H.J.M., Moore A.E., Roberts H.R., Williams A.C., Paraskeva C., Kaidil A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30(3): 377-386, 2009.

Grosch S., Tegeder I., Niederberger E., Brautigam L., Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J.*, 15: 2742-2744, 2001.

Guroff G. PC12 cells as a model of neuronal differentiation. *Curr. Top. Neurobiol.*, 245-272, 1985.

Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, 29(2): 345-350, 2001.

Harris R.E., Alshafie G.A., Abou-Issa H., Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.*, 60: 2101–2103, 2000.

Hernández-Ángeles A., Soria-Jasso L.E., Ortega A., Arias-Montaña J.A. Histamine H₁ receptor activation stimulates mitogenesis in human astrocytoma U373 MG cells. *J. Neur. Oncol.*, 55: 81–89, 2001.

Ikegaki N., Shimadab H., Foxa A.M., Regana P.L., Jacobsa J.R., Hicksa S.L., Rappaportc E.F., Tanga X.X. Transient treatment with epigenetic modifiers yields stable neuroblastoma stem cells resembling aggressive large-cell neuroblastomas. *PNAS*, 10: 1-6, 2011.

Kleihues P., Soylemezoglu F., Schaule B., Scheithauer B.W., Burger P.C. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia*, 15: 211–221, 1995.

Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E., Saarloos I., Wirtz K., Coffe P.J., Huang T.T., Bos J.L., Medema R.H., Burgering B.M. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419:316-321, 2002.

Kuipers G., Slotman B., Wedekind L., Stoter T., Van den Berg J., Sminia P., Lafleur M. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int. J. Radiat. Biol.*, 83:677-685, 2007.

Lehr C.M. Cell Culture Models of Biological Barriers: In Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery, Taylor and Francis, London, 2002.

Liu W., Chen Y., Wang W., Keng P., Finkelstein J., Hu D., Liang L., Guo M., Fenton B., Okunieff P., Ding I. Combination of radiation and celebrex (celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth. *Am. J. Clin. Oncol.*, 26:S103-109, 2003.

Ma H.I., Chiou S.H., Hueng D.Y., Tai L.K., Huang P.I., Kao C.L., Chen Y.W., Sytwu H.K. Celecoxib and radioresistant glioblastoma-derived CD133+ cells: improvement in radiotherapeutic effects. Laboratory investigation. *J Neurosurg.*, 114(3): 651-662, 2011.

McKersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 111: 1177-1181, 1996.

Nam D.H., Park K., Park C., Im Y.H., Kim M.H., Lee S., Hong S.C., Shin H.J., Kim J.H., Eoh W., McDonnell T.J. Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol. Rep.*, 11:263-268, 2004.

Pruthi R.S., Derksen J.E., Moore D. A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *BJU Int.*, 3: 275-278, 2004.

Reed J.C. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 157(5): 1415-1430, 2000.

Royall J.A., Ischiropoulos H. Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 302: 348-355, 1993.

Schäfer G., Cramer T., Suske G., Kemmer W., Wiedennmann B., Hocker M. Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp-1 and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *J. Biol. Chem.*, 278: 8190-8198, 2003.

Simone A.M., Li Y.J., Broemeling L.D., Johnson M.M., Tuna M., Tari A. Cyclooxygenase-2 is essential for HER/neu to suppress N-(hydroxyphenyl) retinamide apoptotic effects in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 64: 1224-1228, 2004.

Spinelli O., Corrons F.J., Reigosa M., Carri N.G. Apoptosis of neuronal PC12 cells in short term microassay, a study of path to apoptosis (apopath). *FASEB J.*, 11: 425. 1997.

Subbaramaiah K., Telang N., Ramonetti J.T., Araki R., DeVito B., Weksler B.B. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 56(19): 4424-4429, 1996.

Weber A., Casini A., Heine A., Kuhn D., Supuran C.T., Scozzafava A. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J. Med. Chem.*, 47: 550–557, 2004.

Yoshimoto M., Caminada de Toledo S.R., Monteiro E.M., Seixas M.T., Martino M.L, Campos S., Rossi S.M., Schettini S.T., Duffles J.A. MYCN Gene Amplification: identification of cell populations containing double minutes and homogeneously staining regions in neuroblastoma tumors. *Am. J. Pathol.*, 155(5): 1439-1443, 1999.

Zhang Y., Tao J., Huang H., Ding G., Chenga Y., Suna W. Effects of celecoxib on voltage-gated calcium channel currents in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Pharm. Res.*, 56: 267-274, 2007.

*IV- ELABORACIÓN DE MICROESFERAS
DE CELECOXIB*

1. INTRODUCCIÓN

Un tumor es un conjunto de células que crecen y se multiplican de forma anómala, pudiendo ser primario, cuando se forma a partir de las propias células que componen los tejidos, por ejemplo el cerebro, y metastásico, cuando su origen está en un tumor localizado en otra zona del organismo, y que se ha diseminado al cerebro. En los adultos los tumores cerebrales primarios ocupan el 13º lugar en frecuencia de todos los cánceres. En España, se calcula una incidencia de 8,73 en varones y 5,41 en mujeres por 100.000 habitantes/año. (AECC, 2014).

Los tumores metastásicos son mucho más frecuentes que los primarios, ya que entre un 20-40% de los enfermos de cáncer pueden desarrollar metástasis cerebrales. Dentro de los tumores primarios, en los adultos predomina el glioblastoma multiforme y el astrocitoma anaplásico; ambos malignos y con mal pronóstico, debido a su alta tasa de recidiva tras la cirugía. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor más común, es de rápido crecimiento y puede manifestarse a cualquier edad, aunque afecta principalmente a adultos, con un pico de incidencia entre los 45 y los 70 años (Morshedy y col., 2013).

El tratamiento depende del tamaño y del tipo de tumor, de la velocidad de crecimiento, y del estado general de salud del paciente, pero habitualmente se realiza mediante la combinación de tres herramientas terapéuticas: cirugía, radioterapia y quimioterapia (Stupp y col., 2009).

La radioterapia puede usarse sola o en combinación con la cirugía y/o la quimioterapia en el tratamiento de los tumores cerebrales primarios o metastásicos. La extirpación completa del tumor permite curar al paciente cuando el tumor es benigno y, cuando no es benigno, su extirpación favorece la eficacia de los tratamientos coadyuvantes de radioterapia y quimioterapia. A menudo es necesario realizar una biopsia para confirmar el diagnóstico; con esta intervención se puede realizar, en ocasiones, la extirpación completa o parcial del tumor.

Una de las complicaciones más habituales de la intervención quirúrgica es la inflamación o edema cerebral que se produce tras la intervención. Cuando el edema provoca un aumento de la presión cerebral, puede causar dolores de cabeza, somnolencia y dificultad para caminar. Algunas veces el edema causa en realidad más síntomas que el propio tumor. Por este motivo es frecuente el uso de esteroides para controlar los síntomas a corto plazo, e incluso puede ser necesaria su utilización durante semanas o meses. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes que presenta el uso de estos fármacos, además de los efectos adversos habituales, es la aparición de insomnio, cambios de humor, debilidad muscular o atrofia muscular de piernas, brazos y cuello. Estos síntomas pueden tener una relevancia especial en aquellos pacientes que requieren rehabilitación para recuperar la movilidad tras la extirpación del tumor (*Wen y Kesari, 2008*).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) llevan empleándose un siglo en terapéutica para reducir la inflamación, la fiebre y el dolor. Estudios llevados a cabo en los últimos años indican que muchos de los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) actúan como potenciales agentes para la prevención y el tratamiento del cáncer. En

concreto, los inhibidores selectivos de la COX-2 presentan la ventaja de actuar sobre blancos moleculares específicos. Como ya se ha indicado, la COX-2 es un enzima que se encuentra sobreexpresada en una gran variedad de tumores humanos (*Gately y Li, 2004; Greenhough y col., 2009*).

Dentro del grupo de AINEs inhibidores selectivos de la COX-2, el CXB además de modular eficazmente la inflamación y el dolor, ha demostrado ser eficaz a dosis elevadas como inhibidor del crecimiento de células cancerígenas (*Harris y col. 2000; Simone y col., 2004*).

En este sentido hay numerosos estudios *in vivo* y ensayos clínicos que señalan el papel que el CXB podría tener en la reducción de ciertos cánceres cuando se emplea en politerapia como coadyuvante de agentes quimioterápicos (*Peulen y col., 2013; Zhang y col., 2013; Wang y col., 2014*). Este fármaco también ha demostrado poseer actividad antiproliferativa *in vitro* sobre distintas líneas celulares de cáncer (*Deng y col., 2013; Sadeghi-Aliabadi y col., 2013*) incluidas líneas celulares de glioblastoma (*Sareddy y col., 2012*).

Además estudios recientes realizados con el CXB han puesto de manifiesto su eficacia en la reducción del cáncer cuando se combina con la radioterapia debido a que posee un efecto radiosensibilizador (*Ma y col., 2011; Kim y Pyo, 2013*).

Sin embargo, la administración de CXB por vía sistémica presenta una serie de efectos adversos a nivel renal y cardiaco, especialmente en pacientes con nefropatías preexistentes e insuficiencia cardiaca, efectos que se verían incrementados al tener que aumentar la

dosis para conseguir, además de los efectos antiinflamatorio y radiosensibilizante, un efecto antiproliferativo.

Por este motivo, la microencapsulación de ingredientes activos tales como el CXB, permite el diseño de sistemas de liberación controlada con el fin de lograr concentraciones terapéuticas de principio activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso (*Alonso y col., 1994; Varde y Park, 2004*). Con estos sistemas se pueden obtener concentraciones terapéuticas durante un largo período de tiempo utilizando una única dosis, con el objetivo de eliminar o minimizar las concentraciones máximas que exceden los requerimientos terapéuticos y aumentan los efectos adversos (*Park col., 2005; Fernández y col., 2011*).

La vía de administración parenteral es la que presenta mayores ventajas, ya que permite la liberación del principio activo durante un tiempo prolongado. En ocasiones, durante la intervención quirúrgica, se introducen implantes con diferentes agentes activos que se depositan en la cavidad creada tras la extirpación del tumor, para así lograr la liberación de agentes antitumorales en el lugar de acción. Estos sistemas se deben elaborar con material biocompatible y biodegradable, para no tener que retirarlos una vez hayan liberado el compuesto activo.

Entre los materiales más utilizados en el desarrollo de sistemas microparticulados para la liberación controlada de ingredientes activos, destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de los ácidos láctico y glicólico (PLGA) (*Anderson y Shive, 1997*). Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas de administración por vía parenteral. (*Jalil y Nixon, 1990; Montejo y col., 2010; Garbayo y col.,*

2013). Se obtienen mediante la policondensación lineal de los hidroxiácidos o mediante la apertura del anillo de las lactonas correspondientes (*Kricheldorf y col., 1985*).

Estos polímeros son solubles en solventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y tetrahidrofurano; pero no son solubles en agua. Algunos son cristalinos y otros amorfos, dependiendo de su composición en cuanto a ácido láctico y glicólico. Los amorfos son los más empleados en el diseño de formulaciones de liberación controlada. Difieren en la proporción de los monómeros que lo componen, en su masa molecular (entre 5 y 100 kDa, aproximadamente) y en el grupo terminal (-COOH o -COOR). Estos tres parámetros determinan, su hidrofobicidad y su cinética de degradación, y a su vez, la eficacia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada. El término biodegradable en estos polímeros se refiere a la hidrólisis de sus enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. Esta reacción produce ácido láctico y glicólico, los cuales son metabolizados en el ciclo de Krebs hasta formar agua y CO₂ (*Tamber y col., 2005*).

Cuando se emplean como matrices en la obtención de microesferas, su degradación transcurre en dos etapas. La primera comprende la hidrólisis de los enlaces éster, llamada degradación, y en la cual se generan oligómeros y monómeros, con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa (erosión), se produce la pérdida de masa de la matriz, pudiendo aumentar la velocidad de hidrólisis de los enlaces debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida originados (*Göpferich, 1996*).

Los PLGA son biocompatibles, ya que no provocan toxicidad cuando se introducen en el organismo por diferentes vías (*Visscher y col., 1985*).

Por todo ello, la elaboración de una formulación de microesferas de CXB para ser implantada en el cerebro tras la extirpación parcial o total de un tumor, permitirá la reducción de la inflamación y/o edema post-traumático y mejorará la eficacia de la radioterapia. Además, la actividad antiproliferativa del CXB frente a diferentes líneas celulares, podría inhibir el crecimiento de distintos tipos de células cancerígenas.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es desarrollar una formulación de microesferas biodegradables de CXB para ser implantada en el cerebro tras la extirpación parcial o total de un tumor, y para ser empleada como coadyuvante en el tratamiento de tumores cerebrales. Con este implante se pretenden lograr una reducción de la inflamación y/o edema post-traumático, mejorar la eficacia de la radioterapia e inhibir la proliferación de las células cancerígenas.

Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollar microesferas de CXB empleando un polímero biodegradable PLGA RG[®] 503.

2. Caracterizar la formulación mediante: microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos láser, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido (DSC). Determinar las eficacias del proceso y de encapsulación, así como evaluar la liberación *in vitro* del CXB a partir de las microesferas desarrolladas.
3. Seleccionar la formulación más adecuada, que presente la mayor cantidad de fármaco encapsulado y una liberación constante de CXB durante el mayor tiempo posible.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

○ Preparación de microesferas de celecoxib

Las microesferas de CXB se han elaborado mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A.

Para ello se ha procedido a preparar dos formulaciones de microesferas con PLGA RG[®]503 y elaboradas con porcentajes del 10% y 20% de CXB, respectivamente. Se han preparado además microesferas blanco.

El proceso de elaboración empleado es el siguiente:

1) Fase acuosa de la emulsión: se preparara una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 0,1% que se deja en agitación magnética.

2) Se pesan 200 mg de PLGA RG[®]503 que se disuelven mediante agitación en 1 ml de diclorometano (Panreac Química S.A., España).

3) Fase orgánica de la emulsión: se añaden diferentes cantidades de CXB (20 ó 40 mg) sobre la disolución del polímero y se agita en vórtex hasta la obtención de una mezcla homogénea.

4) Se añade la fase orgánica sobre 10 ml de fase acuosa.

5) Se agita durante 3 minutos a 3000 rpm en homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT 3000 Kinematica®, USA) para formar la emulsión. Se añade sobre la solución acuosa de PVA al 0,1% en agitación.

6) Se procede a evaporar el disolvente orgánico, utilizando para ello un agitador vórtex durante 3 horas.

7) Se toma una muestra para verificar al microscopio óptico que se han formado las microesferas y verificar su estado de agregación.

8) Se separan por filtración las microesferas con filtros de 5,0 µm (Millipore[®] SMWP, USA) y se realiza un lavado con 50 ml de agua destilada.

9) Se dejan las microesferas en el congelador durante 15 minutos y por último, se liofilizan (Flexi-Dry MP™, FTS Systems, USA) durante 3 horas para eliminar la humedad remanente.

Mediante este procedimiento se han obtenido dos formulaciones de microesferas cuya composición es la siguiente:

Formulación F1: 200 mg de PLGA 503 y 20 mg de CXB (cargadas al 10%).

Formulación F2: 200 mg de PLGA 503 y 40 mg de CXB (cargadas al 20%).

Cada formulación de microesferas se prepara por triplicado.

En la figura 17 se muestra en un esquema el método empleado para la preparación de las microesferas de CXB.

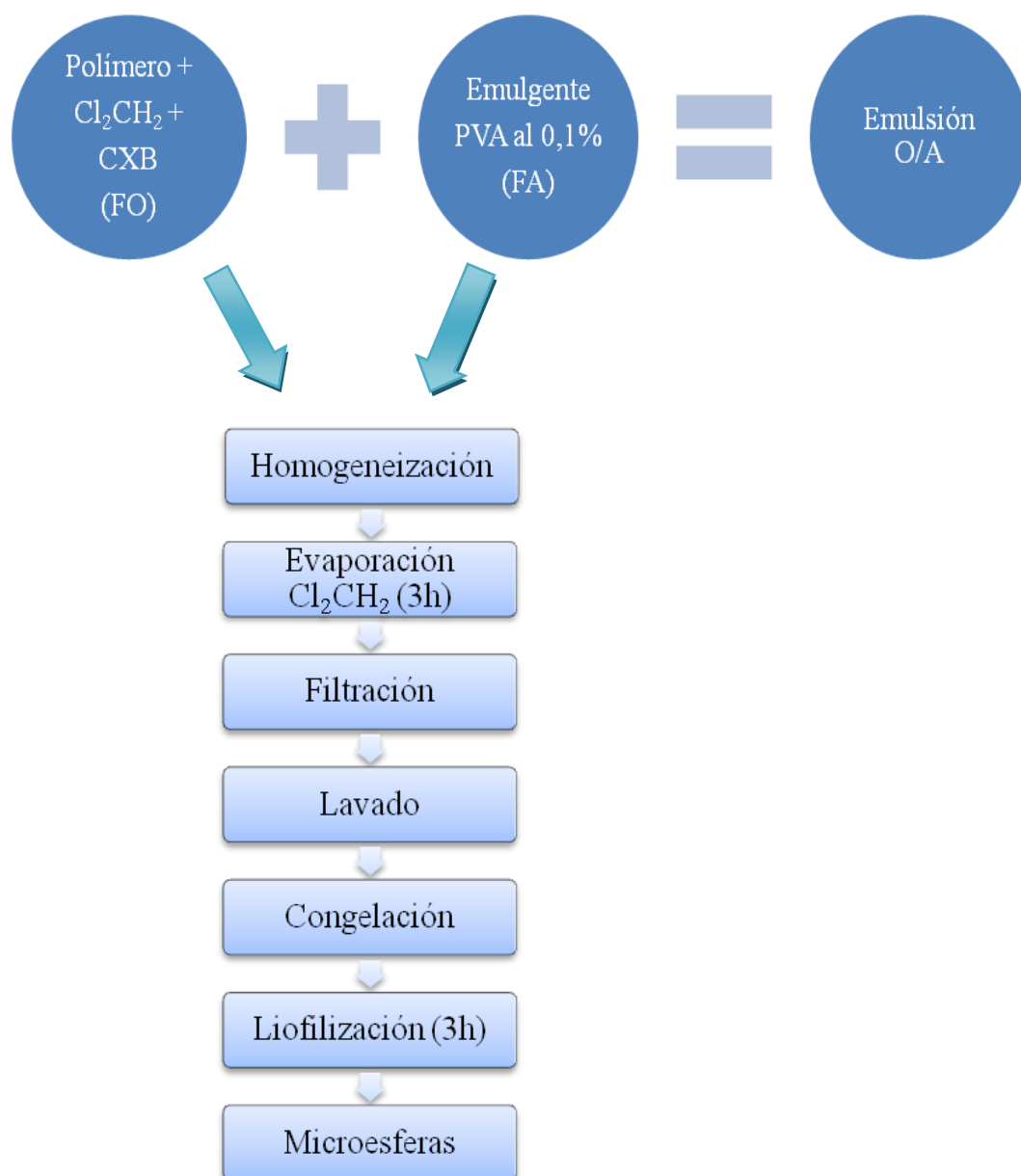


Fig. 17.- Método de evaporación-extracción del disolvente utilizado para la preparación de microesferas de celecoxib.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS

4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido permite evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las microesferas. Para ello se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido (Joel, JSM-6400, Japón).

Las muestras se fijan al portamuestras, sometiéndolas a un proceso de recubrimiento con una capa de oro de aproximadamente 15 nm. Mediante este procedimiento se han analizado muestras de microesferas blanco y microesferas cargadas con CXB (formulaciones F1 y F2).

○ Distribución del tamaño de partícula por difracción de rayos láser

Se ha determinado la distribución de tamaños de las diferentes formulaciones de micropartículas preparadas (F1 y F2). Para llevar a cabo esta determinación se ha empleado la técnica de difracción de rayos láser utilizando el equipo Microtrac[®] S35000 Particle Size Analyzer (Microtrac[®], USA). Para el análisis granulométrico, se preparó una suspensión de cada formulación de microesferas en agua destilada, agitándose en vórtex para facilitar la dispersión de las mismas y evitar la formación de agregados.

Se obtienen las curvas de distribución de tamaños y el diámetro medio de las microesferas. El diámetro medio de las microesferas obtenidas se expresa como diámetro volumen y la distribución de tamaños se representa gráficamente mediante curvas distributivas de volumen.

4.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los análisis de difracción de rayos X se llevan a cabo con un difractómetro automático de polvo Philips X'Pert MPD (CAI, Difracción Rayos X, UCM), con una configuración 0-20, en el rango angular 5° , 2θ , tamaño de paso $0,04^\circ$ 2θ y tiempo de conteo de 1 segundo por paso. En estas condiciones se han evaluado muestras de CXB, PLGA 503, formulaciones F1 y F2 y microesferas no cargadas.

4.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Para determinar el estado físico de los componentes, se realizó un análisis térmico mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). El equipo empleado fue un DSC 820 (Mettler Toledo, USA). El ensayo se realiza en un rango de temperaturas de -40°C hasta 190°C con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. bajo corriente de nitrógeno. Para llevar a cabo este estudio se pesó una cantidad fija de muestra (1-3mg). Las muestras se introducen en una cápsula de aluminio que se sella con una tapa del mismo material (cápsula muestra), empleándose una cápsula de aluminio vacía como referencia. El estudio de DSC se ha

realizado con muestras de CXB, PLGA 503, PLGA 503 con celecoxib y microesferas sin cargar.

4.4. DETERMINACIÓN DE LAS EFICACIAS DEL PROCESO Y DE ENCAPSULACIÓN

Para la determinación del rendimiento del proceso, una vez separadas las microesferas, se pesan y se determina la cantidad de microesferas obtenidas por el método de preparación.

Por lo que se refiere al contenido de principio activo de las microesferas (eficacia de encapsulación) se determina disolviendo 10 mg de microesferas en 1 ml de diclorometano, se agita en vórtex hasta que se produce la rotura de las microesferas. A continuación se añaden 15 ml de etanol con el fin de disolver el principio activo y conseguir la precipitación del polímero. Las muestras se someten a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm y se pasan por un filtro de 0,45 μm . Se extrae una alícuota de 1 ml y se diluye con etanol para cuantificar el contenido.

Se determina el CXB encapsulado mediante el método de cromatografía líquido-líquido de alta resolución validado y que queda recogido en el capítulo correspondiente de esta memoria experimental. Con este método se ha calculado la eficacia de encapsulación para las dos formulaciones de microesferas preparadas (F1 y F2) y por triplicado.

La eficacia o rendimiento de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el principio activo que realmente ha sido

encapsulado y aquel en disposición de ser encapsulado, a partir de la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{p.a. / polímero}_{\text{experimental}}}{\text{p.a. / polímero}_{\text{teórico}}} \times 100$$

El rendimiento de encapsulación también se puede expresar como mg de principio activo (p.a.)/100 mg de microesferas.

4.5. ENSAYOS DE CESIÓN

Los ensayos de cesión se llevan a cabo en un baño termostatzado Memmert WNB 45 (Memmert, Alemania) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, con una agitación de vaivén constante de 100 rpm. Para realizar estos estudios, se pesan 20 mg de microesferas de cada formulación (F1 y F2). Las microesferas se suspenden en 3 ml de tampón fosfato preparado con laurilsulfato sódico al 1% y al 3%, respectivamente (pH 7,4).

A los tiempos de muestreo fijados (1, 2, 3, 6, 7, 9, 13, 15, 16, 20, 22, 23, 27, 29, 30, 31, 34, 36, 37, 41, 43, 48, 52 y 56 días) se extrae completamente el medio de disolución con la ayuda de una aguja acoplada a una jeringa (para no extraer microesferas), renovando con 3 ml de solución tampón recién preparada. A continuación se procede a filtrar las muestras a través de filtros de $0,45 \mu\text{m}$. El contenido de principio activo se cuantifica mediante espectrofotometría UV directa a una longitud de onda de 252,5 nm, que se encuentra recogido en el capítulo correspondiente de esta memoria experimental.

Los ensayos se realizan por duplicado para cada uno de los lotes.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS MICROESFERAS

○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las figuras 18-20 se muestran, a modo de ejemplo, microfotografías obtenidas por SEM de microesferas no cargadas y cargadas con CXB (correspondientes a ambas formulaciones; F1 y F2).

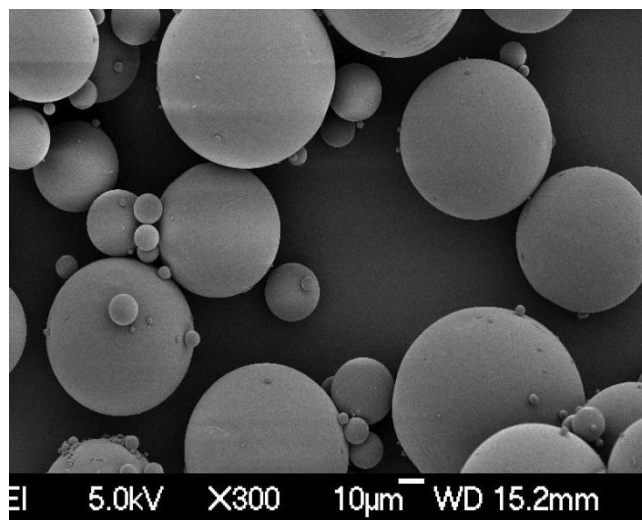


Fig. 18.- Microfotografía obtenida por SEM de microesferas blanco.

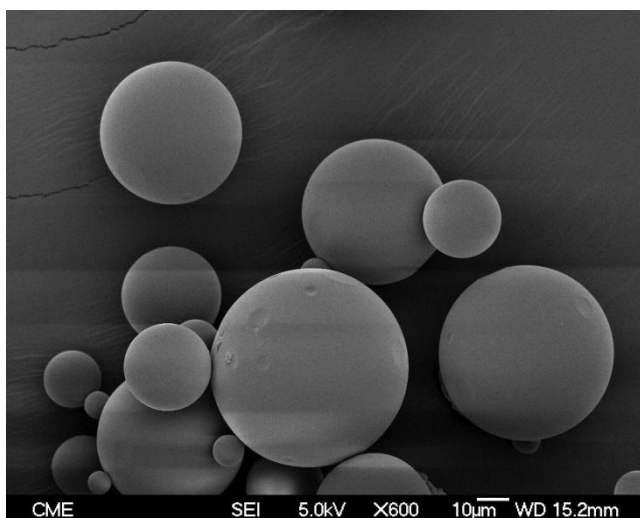


Fig. 19.- Microfotografía obtenida por SEM de microesferas correspondientes a la formulación F1.

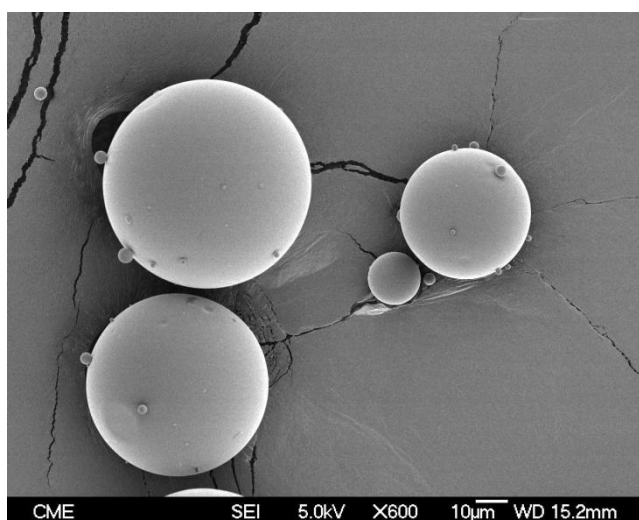


Fig. 20.- Microfotografía obtenida por SEM de microesferas correspondientes a la formulación F2.

La microscopía electrónica de barrido muestra que, en todos los casos, las microesferas son rígidas, esféricas y con superficies lisas, con

independencia de que estén o no cargadas y de la cantidad de CXB utilizada en su preparación. Por SEM se observa que el tamaño medio de partícula es inferior a 100 μm , por lo que presentan un tamaño que permitiría su implantación en el tumor una vez que se realiza la biopsia. (Menei y col., 2005).

- **Distribución del tamaño de partícula por difracción de rayos láser**

El diámetro medio se expresa como diámetro volumen y la representación gráfica se expresa mediante curvas distributivas de volumen.

El tamaño promedio de la formulación F1 es de $57,89 \pm 36,21$ μm (figura 21).

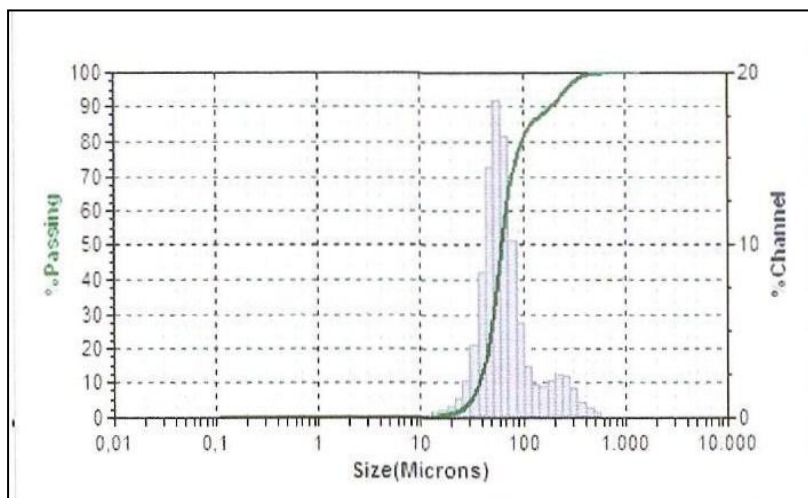


Fig. 21. – Curva de distribución de tamaños obtenida para la formulación F1.

El tamaño promedio de la formulación F2 es de $52,22 \pm 23,05$ μm (figura 22).

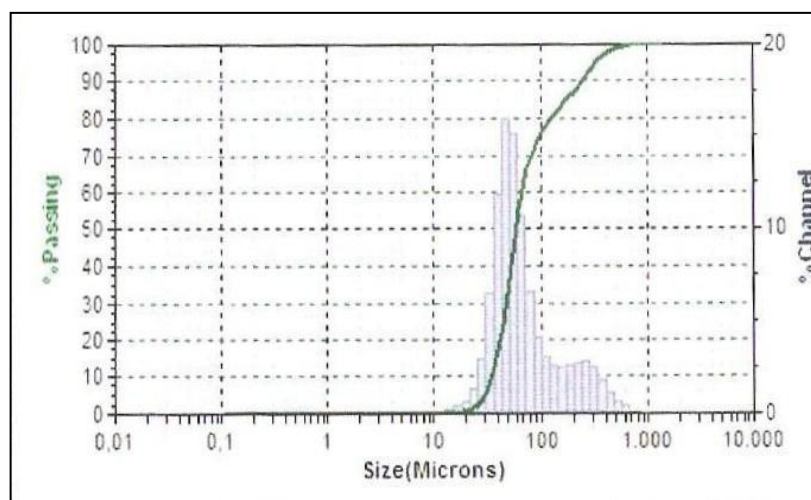


Fig. 22.- Curva de distribución de tamaños obtenida para la formulación F2.

El análisis de la mono o polidispersión del tamaño de partículas de las microesferas se realiza mediante el cálculo del coeficiente Span (coeficiente de dispersión del tamaño de partícula), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Span} = (D90 - D10)/D50$$

Donde D_n ($n = 10, 50$ y 90) corresponde al diámetro de partícula en el 10%, 50% y 90% de la distribución del volumen. Un valor elevado de Span es indicativo de una distribución más heterogénea en la distribución de tamaños. Se considera que una población de microesferas es monodispersa cuando se obtienen valores de Span inferiores a 0,44 (Xiao y col., 2005.).

En nuestro caso, los valores de Span obtenidos para las formulaciones F1 y F2 son 0,91 y 1,42 respectivamente, ambos valores son superiores a 0,4. La distribución de la formulación 2 es más heterogénea que la de la formulación F1.

El tamaño de partícula es una característica importante de las microesferas, ya que condiciona la eficacia de encapsulación y la velocidad de cesión del principio activo, que será menor al disminuir la superficie específica.

Las micropartículas deben tener un tamaño inferior a 180 μm para que puedan ser implantadas en el cerebro. Cuando el tamaño de las micropartículas es inferior a 30 μm , pueden ser fagocitadas por los macrófagos y eliminadas rápidamente de circulación. Por este motivo nos interesan tamaños superiores a 10-20 μm para que permanezcan durante el mayor tiempo posible en el lugar de administración (*Wischke y col., 2006*). En nuestro caso hemos obtenido para las dos formulaciones F1 y F2 tamaños medios próximos a 60 μm .

5.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

A continuación se presentan los difractogramas de rayos X obtenidos para CXB, PLGA 503, microesferas blancas y para las formulaciones F1 y F2.

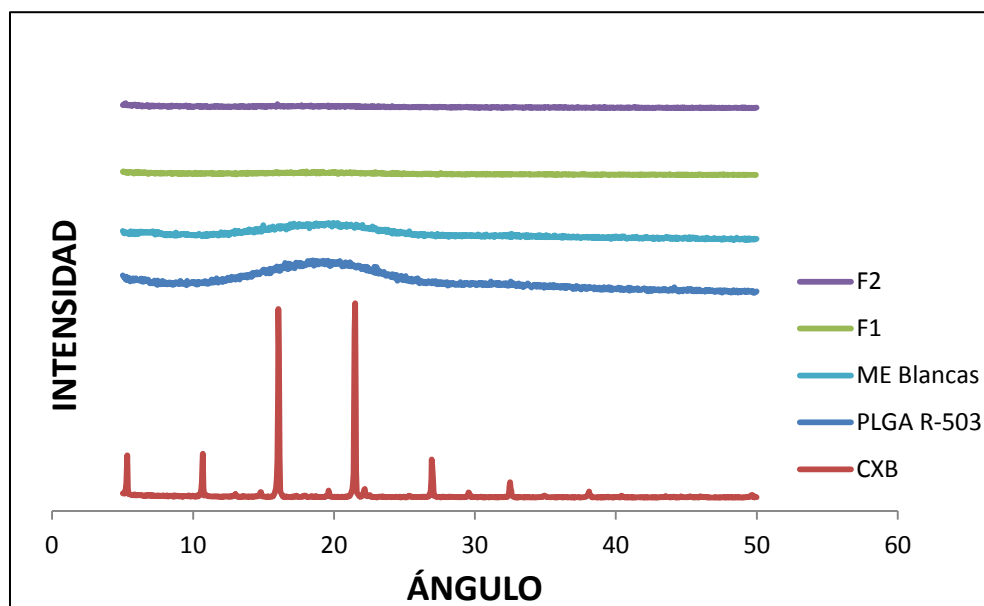


Fig. 23.- Difractogramas de rayos X correspondientes a CXB, PLGA 503, microesferas no cargadas y a las formulaciones F1 y F2.

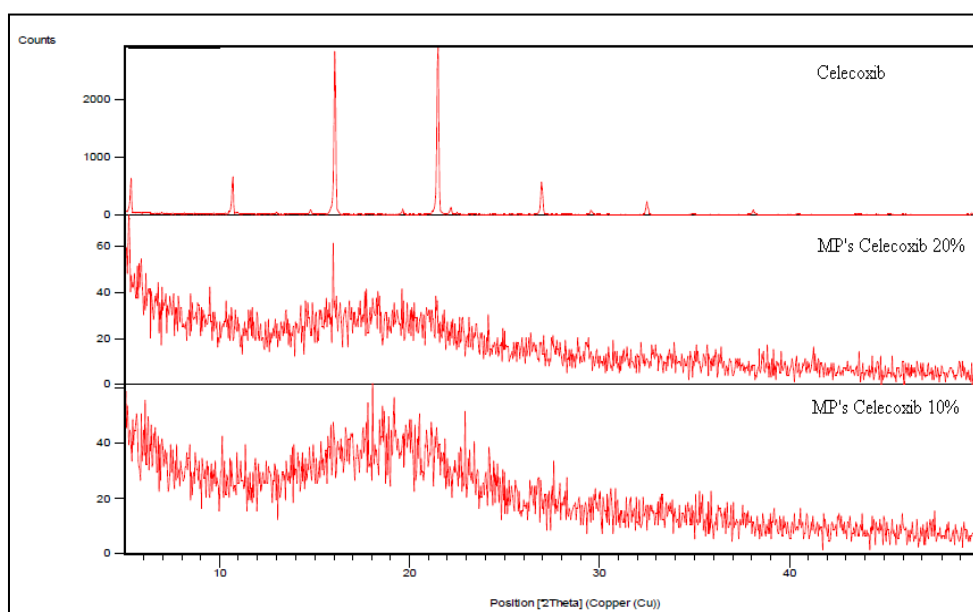


Fig. 24.- Difractogramas de rayos X ampliados y correspondientes a CXB y a las formulaciones F1 y F2.

El análisis de difracción de rayos X del principio activo dio lugar a un difractograma con máximos de difracción más intensos a 5,3°; 10,5°; 16°; 21,5°; 26,9°; 32,5°; 38,1° característicos del CXB, lo que nos indica el carácter cristalino del mismo.

Por el contrario, en el difractograma obtenido para polímero PLGA 503, no se aprecian máximos, lo que nos confirma el estado amorfo del mismo. Cuando realizamos el análisis con la formulación F1 no se observan los máximos correspondientes al principio activo, lo que indica que el principio activo se encuentra, o bien en un porcentaje muy bajo o no se encuentra al estado cristalino en el interior de la microesfera. Sin embargo al analizar el difractograma correspondiente a la formulación F2 sí se distingue un pico máximo de intensidad, lo que puede indicarnos que el principio activo está parcialmente disuelto en la microesferas de esta formulación, en las que hay además una proporción más elevada de fármaco.

5.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

En la figura 25 están recogidos los termogramas obtenidos para CXB, PLGA 503, microesferas blancas y las microesferas CXB de la formulación F1.

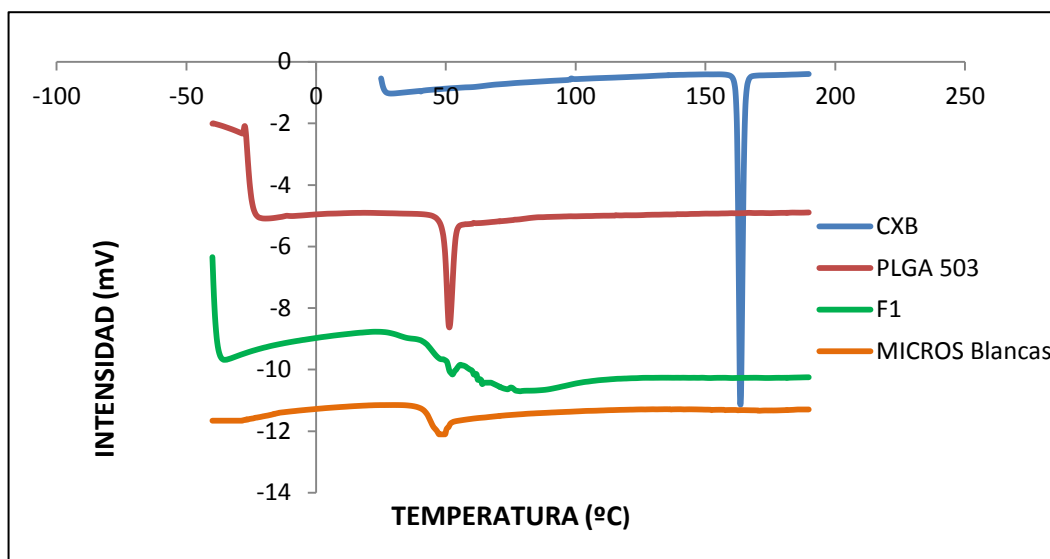


Fig. 25.- Termogramas obtenidos por DSC para CXB, PLGA 503, microesferas blancas y microesferas cargadas con CXB (formulación F1).

En el termograma obtenido para el CXB se observa un pico endotérmico a una temperatura de 158,66°C, valor que se corresponde con su punto de fusión, y que coincide con el indicado en la literatura, que oscila entre 156°C y 159°C (Simon y col., 1998).

El termograma correspondiente al polímero PLGA 503 muestra una temperatura de transición vítrea (Tg) de 44,1 °C, similar a los datos recogidos en la literatura. La Tg es la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de los polímeros; es una propiedad importante que se ha de tener en cuenta en la preparación de las microesferas y esencial para la evaluación de la estabilidad de la formulación, así como para conocer las propiedades de difusión y la velocidad de biodegradación del polímero. La Tg tiene relación directa

con el peso molecular del polímero. La presencia de humedad en estos sistemas puede alterar la Tg en varios grados centígrados y llegar a un valor cercano a la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las microesferas y por consiguiente, al perfil de liberación del principio activo (*Lewis, 1990*).

Cuando analizamos el termograma correspondiente a las microesferas blanco se observa un descenso en la temperatura de transición vítrea ($T_g = 38,6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este descenso puede atribuirse a errores derivados de la propia técnica analítica.

El termograma correspondiente a las microesferas cargadas con CXB (formulación 1) muestra un descenso en la temperatura de transición vítrea ($T_g = 36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este descenso probablemente sea debido a que el CXB se encuentra total o parcialmente disuelto en la matriz polimérica. Estos resultados confirman los anteriormente obtenidos mediante la técnica de difracción de rayos X. Este descenso en la temperatura de transición vítrea podría comprometer la estabilidad de la formulación, por lo que sería recomendable su almacenamiento en refrigeración y en condiciones de humedad controlada.

5.4. EFICACIAS DEL PROCESO Y DE ENCAPSULACIÓN

En la tabla 13 se recogen los datos obtenidos para el rendimiento del proceso de microencapsulación y correspondientes a los tres lotes de las formulaciones F1 y F2.

Formulación	Rendimiento del Proceso (%)	Rendimiento (%) (Media \pm D.E.)
F 1.1	62,04	62,15 \pm 3,67
F 1.2	58,53	
F 1.3	65,87	
F 2.1	50,18	50,84 \pm 2,33
F 2.2	48,91	
F 2.3	53,43	

Tabla 13.- Resultados individuales y medios (\pm D.E.) del rendimiento del proceso de encapsulación (%) correspondientes a las formulaciones F1 y F2.

El rendimiento medio del proceso de encapsulación para la formulación F1 fue de 62,15 \pm 1,47% y de 50,84 \pm 2,33% para F2, ligeramente inferior en este último caso.

Se determinan la cantidad de CXB y la eficacia de encapsulación (EE) para las formulaciones F1 y F2. La tabla 14 recoge los resultados obtenidos para los tres lotes de microesferas preparados para cadauna de las formulaciones, así como los valores medios y sus desviaciones estándar.

Formulación	Cantidad de CXB (mg)/100 mg de Microesferas	Media \pm D.E.	EE (%)	Media \pm D.E.
F 1.1	8,18	8,17 \pm 0,15	90,75	90,73 \pm 1,74
F 1.2	8,32		92,46	
F 1.3	8,01		88,98	
F 2.1	12,18	12,43 \pm 0,36	73,06	74,57 \pm 2,15
F 2.2	12,27		73,62	
F 2.3	12,84		77,03	

Tabla 14.- Cantidad de principio activo encapsulado/100 mg microesferas y eficacias de encapsulación (valores individuales y medios \pm D.E.) correspondientes a las formulaciones F1 y F2.

La eficacia de encapsulación más elevada se ha obtenido para la formulación F1, que presenta un valor medio de 90,73 \pm 1,74%. Para la formulación F2, la eficacia media de encapsulación fue del 74,57 \pm 2,15%. Aunque en ambos casos se obtienen eficacias medias de encapsulación adecuadas, el valor más elevado corresponde a la formulación F1, es decir a las microesferas que están elaboradas con una cantidad inicial menor de principio activo (10%).

En ambos casos nos encontramos una elevada cantidad de fármaco encapsulado debido a la alta lipofilia del CXB, que muestra una gran afinidad por el polímero y una pobre tendencia a difundirse en la fase acuosa durante la evaporación del disolvente (Cannavà y col., 2013). Sin embargo, si miramos los resultados obtenidos para las

cantidades de CXB encapsuladas, observamos que la formulación F2 contiene una cantidad media de principio activo de 12,43 mg/100 mg de microesferas. Esta cantidad supone un 50% más de carga que la obtenida con la formulación F1. Si tenemos en cuenta la importancia de administrar la mayor cantidad de principio activo, con la mínima cantidad de polímero, la formulación F2 resulta más adecuada para nuestros objetivos. Esta formulación nos permitirá reducir la cantidad de microesferas que hay que administrar.

5.5. ESTUDIOS DE CESIÓN

El ensayo de cesión se realizó por triplicado para las formulaciones F1 y F2. La baja solubilidad del CXB hizo necesario la incorporación de un surfactante al medio de cesión. Se ensayaron dos proporciones de laurilsulfato sódico (LSNa) (1% y 3%) (*Hernández y col., 1998*). Los resultados se compararon con un blanco obtenido a partir de microesferas no cargadas y sometidas a las mismas condiciones que el resto de muestras. Las microesferas blanco no presentaron absorbancia a 252,5 nm en el análisis por espectrofotometría UV realizado, por lo que se descartan las posibles interferencias de pequeñas cantidades de polímero al medio de cesión a lo largo del ensayo.

En las tablas 15 y 16 se recogen los resultados individuales y medios de cesión de CXB a partir de la formulación F1 con una proporción de LSNa al 1% y 3%, respectivamente.

Tiempo (días)	Cantidad cedida lote 1 (µg)	Cantidad cedida lote 2 (µg)	% Cedido acumulado lote 1	% Cedido acumulado lote 2	% Cedido acumulado medio	D. E.
0	0	0	0	0	0	0
1	29,59	28,30	1,79	1,65	1,72	0,10
2	69,67	67,44	4,22	3,92	4,07	0,21
3	97,85	92,87	5,93	5,40	5,67	0,37
6	173,95	156,10	10,54	9,08	9,81	1,04
7	202,47	183,72	12,27	10,69	11,48	1,12
9	259,49	224,03	15,73	13,03	14,38	1,91
13	338,01	316,11	20,49	18,39	19,44	1,49
15	382,28	354,49	23,17	20,62	21,90	1,81
16	412,69	380,52	25,02	22,13	23,57	2,04
20	493,90	450,32	29,94	26,19	28,07	2,65
22	533,74	488,88	32,36	28,43	30,39	2,77
23	562,93	523,47	34,12	30,45	32,29	2,60
27	672,19	640,99	40,75	37,28	39,01	2,45
29	753,53	726,29	45,68	42,24	43,96	2,43
30	807,12	784,57	48,93	45,63	47,28	2,33
31	844,83	848,66	51,21	49,36	50,29	1,31
34	898,60	955,84	54,47	55,59	55,03	0,79
36	935,74	973,91	56,72	56,65	56,69	0,06
37	955,56	1037,93	57,93	60,37	59,15	1,73
41	987,87	1104,35	59,88	64,23	62,06	3,07
43	1003,38	1124,85	60,82	65,43	63,12	3,25
48	1031,82	1139,92	62,55	66,30	64,42	2,65
52	1069,59	1147,74	64,84	66,76	65,80	1,36
56	1092,38	1152,24	66,22	67,02	66,62	0,56

Tabla 15.- *Cantidades y porcentajes cedidos acumulados (\pm D.E.) de CXB (Formulación F1) en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato preparado con LSNa al 1% (pH 7,4).*

Tiempo (días)	Cantidad cedida lote 1 (μg)	Cantidad cedida lote 2 (μg)	% Cedido acumulado lote 1	% Cedido acumulado lote 2	% Cedido acumulado medio	D. E.
0	0	0	0	0	0	0
1	53,21	58,60	3,22	3,55	3,39	0,23
2	118,09	144,37	7,20	8,75	7,98	1,10
3	155,01	182,03	9,45	11,04	10,24	1,13
6	218,52	248,33	13,32	15,06	14,19	1,23
7	252,49	279,60	15,39	16,95	16,17	1,11
9	293,05	318,48	17,86	19,31	18,58	1,03
13	357,07	385,66	21,76	23,38	22,57	1,15
15	387,00	419,09	23,58	25,41	24,50	1,29
16	410,50	438,61	25,01	26,60	25,80	1,12
20	481,77	517,00	29,36	31,35	30,35	1,41
22	541,24	572,65	32,98	34,72	33,85	1,23
23	587,81	608,68	35,82	36,91	36,36	0,77
27	733,45	742,38	44,69	45,01	44,85	0,23
29	829,83	865,46	50,57	52,48	51,52	1,35
30	898,95	923,15	54,78	55,98	55,38	0,85
31	1019,69	997,38	62,14	60,48	61,31	1,17
34	1147,01	1146,17	69,89	69,50	69,70	0,28
36	1242,85	1278,66	75,73	77,53	76,63	1,27
37	1401,57	1392,48	85,41	84,43	84,92	0,69
41	1482,71	1430,54	90,35	86,74	88,55	2,55
43	1513,70	1447,32	92,24	87,76	90,00	3,17
48	1523,07	1508,33	92,81	91,46	92,13	0,96
52	1543,15	1528,31	94,03	92,67	93,35	0,97
56	1559,23	1547,71	95,01	93,85	94,43	0,83

Tabla 16.- Cantidades y porcentajes cedidos acumulados (\pm D.E.) de CXB (Formulación F1) en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato preparado con LSNa al 3% (pH 7,4).

En la tabla 17 se recogen los resultados individuales y medios de cesión de CXB a partir de la formulación F2 con una proporción de LSNa del 3%.

Tiempo (días)	Cantidad cedida lote 1 (µg)	Cantidad cedida lote 2 (µg)	% Cedido acumulado lote 1	% Cedido acumulado lote 2	% Cedido acumulado medio	D. E.
0	0	0	0	0	0	0
1	84,16	81,74	3,39	3,29	3,34	0,07
2	177,18	172,01	7,13	6,92	7,03	0,15
3	217,68	222,25	8,76	8,94	8,85	0,13
6	317,95	336,21	12,79	13,53	13,16	0,52
7	359,02	380,20	14,44	15,30	14,87	0,61
9	414,07	441,83	16,66	17,78	17,22	0,79
13	546,75	580,89	22,00	23,38	22,69	0,98
15	603,05	644,85	24,26	25,95	25,11	1,20
16	640,89	677,75	25,78	27,28	26,53	1,06
20	756,32	786,95	30,43	31,67	31,05	0,88
22	817,97	851,99	32,91	34,29	33,60	0,98
23	867,97	894,31	34,92	35,99	35,45	0,76
27	997,56	1028,74	40,13	41,40	40,77	0,90
29	1101,79	1143,23	44,33	46,01	45,17	1,19
30	1196,02	1229,88	48,12	49,50	48,81	0,98
31	1299,64	1303,44	52,29	52,46	52,37	0,12
34	1458,64	1448,81	58,68	58,31	58,49	0,27
36	1584,68	1544,91	63,75	62,17	62,96	1,12
37	1637,96	1597,32	65,90	64,28	65,09	1,14
41	1708,30	1651,06	68,73	66,45	67,59	1,61
43	1736,47	1678,94	69,86	67,57	68,71	1,62
48	1786,53	1717,97	71,87	69,14	70,51	1,93
52	1825,78	1785,24	73,45	71,85	72,65	1,14
56	1855,79	1817,41	74,66	73,14	73,90	1,07

Tabla 17.- *Cantidades y porcentajes cedidos acumulados (\pm D.E.) de CXB (Formulación F2) en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato preparado con LSNa al 3% (pH 7,4).*

En las figuras 26 y 27 se muestran los perfiles de cesión correspondientes a los porcentajes medios de CXB cedidos a partir de la formulación F1 y con proporciones de LSNa del 1% y 3%.

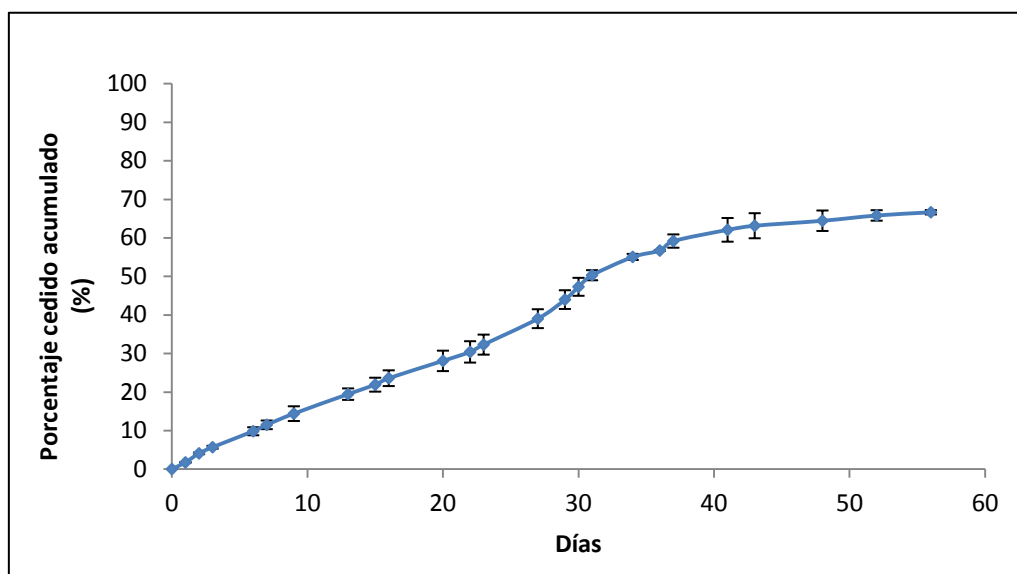


Fig. 26.- Perfil medio de cesión de la formulación F1 utilizando tampón fosfato preparado con LSNa al 1% (pH 7,4).

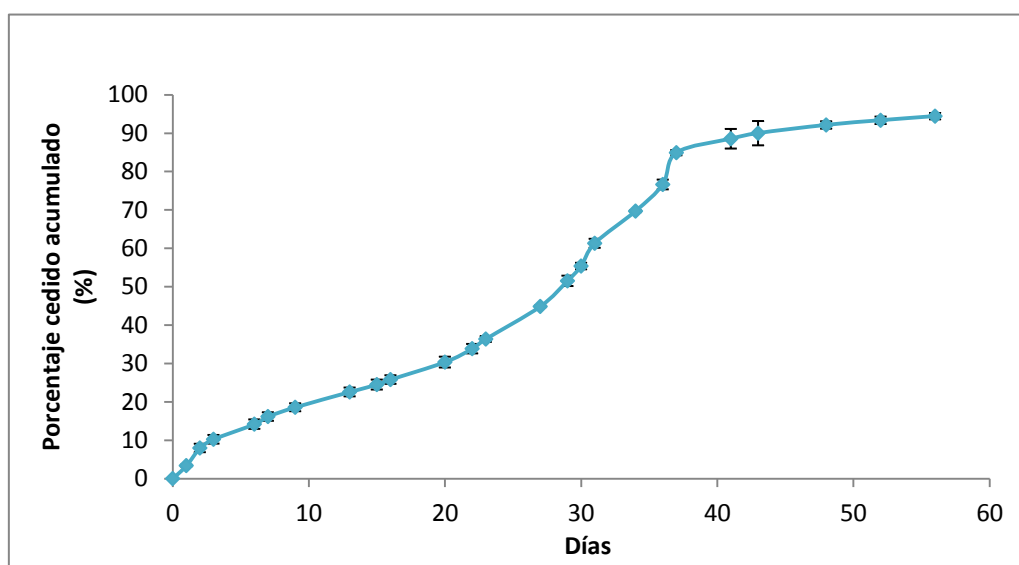


Fig. 27.- Perfil medio de cesión de la formulación F1 utilizando tampón fosfato preparado con LSNa al 3% (pH 7,4).

Se puede observar que tras 56 días de cesión, las microesferas de CXB continúan cediendo fármaco al medio, sin que se haya cedido el 100% del principio activo. Para la misma formulación se observa una mayor cesión de CXB cuando la proporción de LSNa es del 3%, ya que al final del ensayo se ha liberado un 94,43% del principio activo encapsulado. En este caso y durante aproximadamente 34 días, se obtiene una liberación de CXB que se puede ajustar a una cinética de orden cero, con un valor de constante de velocidad de 28,77 $\mu\text{g}/\text{día}$ para 20 mg de microesferas de la F1 (formulación F1).

A la vista de los resultados obtenidos seleccionamos la proporción del 3% de surfactante para realizar nuestros ensayos de cesión del CXB a partir de las microesferas.

En la figura 28 se muestra el perfil de cesión de la formulación F2 obtenido en tampón fosfato con LSNa al 3% (pH 7,4).

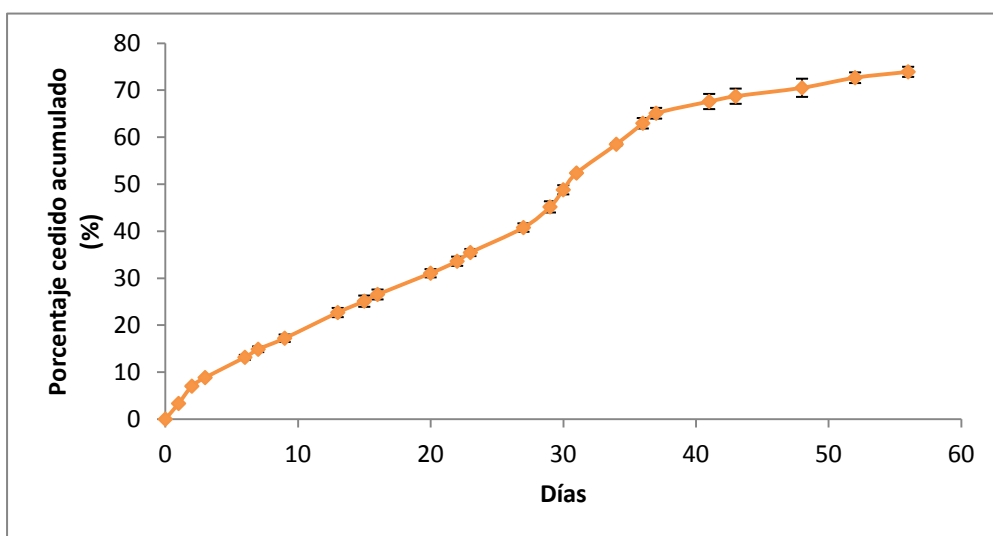


Fig. 28.- Perfil medio de cesión de la formulación F2 utilizando tampón fosfato preparado con LSNa al 3% (pH 7,4).

Como se puede observar, al final del ensayo de cesión las microesferas de la formulación F2 han cedido sólo el 73,90% del principio activo encapsulado, obteniéndose una cinética de liberación próxima a orden cero durante 37 días. La constante de velocidad de liberación de orden cero obtenida durante este tiempo presenta un valor medio de 39,71 µg/día/20mg de microesferas de la formulación F2. Sin embargo, a partir del día 37 la velocidad de cesión es excesivamente lenta para nuestros objetivos.

6. CONCLUSIONES

1. Las formulaciones de microesferas F1 y F2, elaboradas con un 10% y un 20% de CXB respectivamente, presentan un tamaño de partícula medio de unas 60 µm, tamaño que resulta adecuado para que puedan ser implantadas en el cerebro a la vez que se realiza la biopsia.
2. Las microesferas elaboradas con un porcentaje inicial de CXB del 20% (formulación F2), presentan una eficacia de encapsulación de $74,57 \pm 2,15\%$, inferior a la obtenida por la formulación F1. Sin embargo, la elevada cantidad de fármaco encapsulada para 100 mg de microesferas, junto con la cesión *in vitro* de orden 0 de CXB que se obtiene durante 37 días ($K_0 = 39,71 \text{ µg/día/20 mg microesferas}$), hace que resulte más adecuada nuestros objetivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alonso M.J., Gupta R.K., Min C., Siber G.R., Langer R. Biodegradable microspheres controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, 12: 299-312, 1994.

Anderson J.M., Shive M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *AdvDrug Del Rev.*, 28: 5-24, 1997.

Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). <https://www.aecc.es/>.
Último acceso marzo 2014

Cannavà C., Tommasini S., Stancanelli R., Cardile V., Cilurzo F., Giannone I., Puglisi G., Ventura C.A. Celecoxib-loaded PLGA/cyclodextrin microspheres: Characterization and evaluation of anti-inflammatory activity on human chondrocyte cultures. *Colloids Surf Biointerfaces*, 19:289-296, 2013.

Deng Y., Su Q., Mo J., Fu X., Zhang Y., Lin E.H. Celecoxib down regulates CD133 expression through inhibition of the Wnt signaling pathway in colon cancer cells.. *Cancer Invest.*, 31(2):97-102, 2013.

Fernández M., Negro S., Slowing K., Fernández-Carballido A., Barcia E. An effective novel delivery strategy of rasagiline for Parkinson's disease. *Int J Pharm.*, 419 (1-2): 271-280, 2011.

Garbayo E., Ansorena E., Blanco-Prieto M.J. Drug development in Parkinson's disease: from emerging molecules to innovative drug delivery systems. *Maturitas*, 76 (3): 272-278, 2013.

Gately S., Li W.W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *SeminOncol.*, 31(2 Suppl 7): 2-11, 2004.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, Vol.17, pp. 103-114, 1996.

Greenhough A., Smartt H.J.M., Moore A.E., Roberts H.R., Williams A.C., Paraskeva C., Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30(3): 377–386, 2009.

Harris R.E., Alshafie G.A., Abou-Issa H., Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.*, 60: 2101-2103, 2000.

Hernández R.M., Igartua M., Gascón A.R., Calvo M.B., Pedraz J.L. Influence of shaking and surfactants on the release of BSA from PLGA microspheres. *EurJ Drug MetabPharmacokinet.*, 23(2): 92-96, 1998.

Jalil R., Nixon J.R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul.*, 7(3): 297-325, 1990.

Kim Y.M., Pyo H. Different cell cycle modulation by celecoxib at different concentrations. *Cancer BiotherRadiopharm.*, 28(2):138-145, 2013.

Kricheldorf H.R., Jonte J.M., Berl M. Polylactones III. Copolymerization of glycolide with D,L-lactide and other lactones. *Macromolecular Chemistry and Physics*. Vol. 12, pp. 25-38, 1985.

Lewis D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, 1-41, 1990.

Ma H.I., Chiou S.H., Hueng D.Y., Tai L.K., Huang P.I., Kao C.L., Chen Y.W., Sytwu H.K. Celecoxib and radioresistant glioblastoma-derived CD133+ cells: improvement in radiotherapeutic effects. *J Neurosurg.*, 114(3): 651-662, 2011.

Menei P., Montero-Menei C., Venier M.C., Benoit J.P. Drug delivery into the brain using poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Expert OpinBiolTher.*, 2(2): 363-376, 2005.

Montejo C., Barcia E., Negro S., Fernández-Carballido A. Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: development of a new controlled release system. *Int J Pharm.*, 387(1-2):223-229, 2010.

Morshed R.A., Cheng Y., Auffinger B., Wegscheid M.L., Lesniak M.S. The potential of polymeric micelles in the context of glioblastoma therapy. *Front Pharmacol.*, 30(4): 157-170, 2013.

Park J.H., Ye M., Park K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, 10(1): 146-161, 2005.

Peulen O., González A., Peixoto P., Turttoi A., Mottet D., Delvenne P., Castronovo V. The anti-tumor effect of HDAC inhibition in a human pancreas cancer model is significantly improved by the simultaneous inhibition of cyclooxygenase 2. *PLoS One*, 11;8(9): 75-102, 2013.

Sadeghi-Aliabadi H., Aliasgharluo M., Fattahi A., Mirian M., Ghannadian M. In vitro cytotoxic evaluation of some synthesized COX-2 inhibitor derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Res Pharm Sci.*, 8(4): 298-303, 2013.

Sareddy G.R., Geeviman K., Ramulu C., Babu P.P. The nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib suppresses the growth and induces apoptosis of human glioblastoma cells via the NF- κ B pathway. *J Neurooncol.*, 106(1): 99-109, 2012.

Simon L.S., Lanza F.L., Lipsky F.L., Hubbard R.C., Walter S., Schwartz B.D., Isakson P.C., Geis G.S. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor - Efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoidarthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum.*, 41: 1591-1602, 1998.

Simone A.M., Li Y.J., Broemeling L.D., Johnson M.M., Tuna M., Tari A. Cyclooxygenase-2 is essential for HER/neu to suppress N-

(hydroxyphenyl) retinamide apoptotic effects in breast cancer cells. Cancer Res., 64: 1224-1228, 2004.

Stupp R., Roila F.; ESMO Guidelines Working Group. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up. Ann Oncol., 20 (Suppl 4) :126-128, 2009.

Tamber H., Johansen P., Merkle H.P., Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. Adv Drug Delivery Review, pp. 357-376, 2005.

Varde N.K., Park D.W. Microspheres for controlled release drug delivery. Expert OpinBiolTher., 4(1): 35-51 2004.

Visscher G.E., Robinson R.L., Maulding H.V., Fong J.W., Pearson J.E., Argentieri GJ. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly (D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. Journal Biomedical Material Research Part A, Vol 19, pp. 349-365, 1985.

Wang H., Cui X.X., Goodin S., Ding N., Van Doren J., Du Z., Huang M.T, Liu Y., Cheng X., Dipaola R.S., Conney A.H., Zheng X. Inhibition of IL-6 expression in LNCaP prostate cancer cells by a combination of atorvastatin and celecoxib. Oncol Rep., 31(2): 835-841, 2014.

Wen P.Y., Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med., 359(5): 492-507, 2008.

Wischke C., Borchert H.H., Zimmermann J., Siebenbrodt I., Lorenzen D.R. Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J Control Release*, 114(3): 359-368, 2006.

Xiao X.C., Chu L.Y., Chen W.M., Zhu J.H. Monodispersed thermo responsive hydrogel microspheres with a volumen phase transition driven by hydrogen bonding. *Polymer*, 46: 3199-3209, 2005.

Zhang H., Tian M., Xiu C., Wang Y., Tang G. Enhancement of antitumor activity by combination of tumor lysate-pulsed dendritic cells and celecoxib in a rat glioma model. *Oncol Res.*, 20(10): 447-455, 2013.

*V- ELABORACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE CELECOXIB*

1. INTRODUCCIÓN

Existen diversas pautas y técnicas que permiten la administración de agentes antineoplásicos en la terapia de tumores cerebrales. Para estos tratamientos, generalmente se emplean combinaciones de fármacos que se administran en varios ciclos espaciados en el tiempo por vía intravenosa. Uno de los mayores problemas que se generan, es la posibilidad de incompatibilidades entre los diferentes agentes y la dificultad de muchos de ellos para alcanzar el lugar de acción, ya que tienen que atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

La BHE es una estructura histológica y funcional que protege al sistema nervioso central, y que se encuentra constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral, teniendo una importancia capital en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas, de las células gliales y en el bloqueo del acceso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas (*Goldstein y Betz, 1986; Pardridge, 2002*). En el sistema nervioso central los capilares sanguíneos son estructuralmente diferentes de los capilares de otros tejidos; están cubiertos por células endoteliales especiales, sin poros y se distinguen de las de la periferia por la presencia de uniones estrechas continuas, la ausencia de comunicaciones y la falta casi total de pinocitosis. Están compuestos de dos membranas plasmáticas en serie, que forman un endotelio continuo, lo que hace que la BHE sea una barrera tan efectiva (*Davson y Segal, 1996; Begley y Kreuter, 1999*), siendo responsable además de mantener estable la composición del líquido intersticial, indispensable para un adecuado funcionamiento neuronal (*Koziara y col., 2006; Abbott y col., 2010*).

Los vasos capilares en el tejido neuronal están constituidos por una capa simple de células endoteliales, asociadas a una membrana basal, pericitos y una capa casi continua de astrocitos (*De Boer y col., 2003*). Las células endoteliales de los capilares cerebrales tienen una alta resistencia eléctrica y presentan una relación mitocondria/citoplasma alta, secundaria a una actividad metabólica elevada.

Las uniones intercelulares son extremadamente densas y complejas. Su ultraestructura revela una red de filamentos entrelazados con pocos espacios entre ellos, y las células endoteliales yacen sobre una membrana basal compuesta por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y el proteoglicano heparano sulfato que, junto con el colágeno tipo IV, provee una capa de soporte estructural alrededor del vaso (*Abbott y col., 2010*).

Adosados a la membrana basal se encuentran los pericitos, que son células fagocíticas contráctiles y desempeñan un papel importante en la presentación de antígenos, actuando como una segunda línea de defensa.

Aunque las células de la microvasculatura del cerebro contribuyen a la barrera física de la BHE, sus propiedades de permeabilidad son controladas únicamente por las células endoteliales capilares. El movimiento de soluto por la barrera endotelial capilar es a través de dos membranas; las células endoteliales lumenales y aluminales, que están separadas por citoplasma con un grosor de solo 200 nm (*Pardridge, 2002*).

Entre los sistemas de transporte implicados en el paso de compuestos al cerebro a través de la BHE se encuentran el transporte pasivo (difusión simple de moléculas lipofílicas) y el transporte activo (transporte mediado por portadores, receptores, y adsorción y transporte activo de salida) (*Chen y col., 2004*).

El paso de sustancias por difusión pasiva está condicionado fundamentalmente por su lipofilia y tamaño molecular. Así, la hidrofobicidad de la molécula es un requisito importante (*Koziara y col., 2006*) aunque sólo moléculas lipófilas con un peso molecular inferior a 600 Da pueden atravesar la membrana. La sustitución de grupos de unión de hidrógeno por grupos que no tienen afinidad por estos iones aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Sin embargo, estos dos factores podrían reducir el tiempo de permanencia en el plasma, debido a la rápida eliminación de las moléculas altamente lipófilas y a la mala solubilidad de estas sustancias en los fluidos corporales (*Pardridge, 2010*).

Aunque existen muchos compuestos con características de liofilia adecuadas, sin embargo no son capaces de atravesar las células endoteliales que constituyen la BHE, al ser rápidamente devueltas a circulación por sistemas tales como la glicoproteína P (*Begley y Kreuter, 1999*), que es un miembro glucosilado de la superfamilia de transportadores de membrana dependientes de ATP expresado en la superficie de las células, y que interviene en la eliminación de fármacos desde el parénquima cerebral; fármacos entre los que se encuentran antineoplásicos, antibióticos, moduladores de los canales iónicos e inmunosupresores. A este tipo de transporte se le denomina transporte activo de salida (*Newton 2006; Zlokovic 2008*).

El transporte mediado por receptores es un proceso iniciado por la endocitosis del complejo ligando-receptor. Además, está implicado un compartimento endosomal que puede transportarse a los lisosomas o a lo largo del citoplasma para la exocitosis. Este tipo de transporte es saturable y depende de la energía y la temperatura. Estos receptores son capaces de transportar moléculas grandes, como proteínas y también partículas pequeñas. Hasta la fecha se ha demostrado la existencia de varios receptores en la BHE, entre los que se encuentran los receptores de la insulina, la transferrina, el factor de crecimiento similar a la insulina, la leptina y la lipoproteína de baja densidad (*Scherrmann, 2002*).

La superficie de la membrana plasmática de los capilares del cerebro está cargada negativamente a pH fisiológico, debido a la presencia de proteoglicanos, mucopolisacáridos, glucolípidos y glicoproteínas que contienen sulfatos y ácidos siálicos. El denominado transporte por adsorción se produce como resultado de una interacción electrostática, entre la parte del péptido cargada positivamente y la región de la superficie de la membrana plasmática cargada negativamente. Este tipo de transporte es saturable, no específico, se produce a un nivel muy pequeño bajo alteraciones fisiológicas, por lo que ha sido estudiado exhaustivamente como estrategia para mejorar la administración de péptidos y proteínas en el cerebro (*Koziara y col., 2006*).

El objetivo fundamental para tratar enfermedades del SNC es el diseño de fármacos y/o sistemas que sean capaces de atravesar la BHE, para lo cual se han investigado una amplia variedad de estrategias con el fin de lograr este objetivo:

❖ Técnicas invasivas:

- Alteración de la BHE: moléculas activas u osmóticas.
- Inyección directa del fármaco:
 - Administración intracerebral.
 - Administración intraventricular.

❖ Técnicas no invasivas:

- Métodos químicos: modificación química del fármaco.
- Métodos biológicos:
 - Administración intranasal.
 - Inmunosegmentación.
 - Nanopartículas.
 - Tecnologías genéticas.

La nanotecnología busca una mayor efectividad en la terapia del tratamiento de tumores cerebrales, eficacia que inicialmente se puede estudiar administrando los fármacos de forma libre. Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de abordar el paso de fármacos a través de la BHE, entre las que se pueden citar la utilización de sistemas transportadores tales como: anticuerpos (*Pardridge y col. 1991*), liposomas (*Zhou y Huang, 1992; Chen y Lee, 1993*) y nanopartículas (*Grislain y col., 1983; Couvreur y col., 1986*).

El desarrollo de nanopartículas es una de las estrategias más prometedoras para lograr el paso de fármacos a través de la BHE. Las nanopartículas de polímeros biodegradables son sistemas estables, se adaptan fácilmente a los procesos de fabricación y se puede modular sus propiedades modificando su superficie. Las nanopartículas se pueden diseñar para controlar tanto la velocidad de liberación de los fármacos como para controlar su localización en algún lugar específico del organismo (*Brannon-Peppase y Blanchette., 2004*). La modulación de sus características se logra a través de las propiedades del polímero utilizado y de la composición química de la superficie de las mismas (*Yokohama, 2005*).

Se ha investigado una amplia variedad de estrategias para permitir el paso de nanopartículas de PLGA a través de la BHE, que permitan la liberación de fármacos en el lugar de acción. El objetivo de estas estrategias es transportar el fármaco hacia el lugar de acción, disminuyendo su toxicidad y permitiendo distanciar las dosis.

Una limitación importante de los nanosistemas de PLGA es que el organismo los reconoce como partículas extrañas, por lo que son rápidamente opsonizadas y eliminadas del torrente circulatorio antes de que puedan cumplir su función. Con el fin de aumentar la semivida plasmática de las nanopartículas de PLGA y, favorecer su paso a través de la BHE, la mayoría de las estrategias están orientadas a modificar la superficie de las mismas (*Hanson y Frey, 2008*). La modificación química de la superficie de las nanopartículas permite mejorar la captación celular y evitar una rápida opsonización de estos sistemas (*Kreuter, 2001*).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el recubrimiento de nanopartículas con polisorbato 80 (Tween 80) favorece su transporte a través de la BHE (*Kreuter y col., 1995; Schroeder y col., 1998; Gulyaev y col., 1999; Kreuter 2001; Wilson y col., 2008*). Así por ejemplo, la inyección por vía intravenosa de nanopartículas de doxorubicina recubiertas con polisorbato 80 resultó en tasas de curación del 40% en animales de experimentación (ratas) a los que se había trasplantado gliomas intracranealmente (*Kreuter, 2001*). Las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80 generan la adsorción de las apolipoproteínas A-I y E (*Kreuter, 2001; Kreuter y Gelperina, 2008; Zensi y col., 2010*), apolipoproteínas que interactúan con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se expresan en la BHE (*Mittal y col., 2011*), y promueven la captación de las nanopartículas por las células endoteliales capilares cerebrales a través de endocitosis mediada por receptores (*Michaelis y col., 2006*).

En este sentido, la elaboración de nanopartículas de PLGA funcionalizadas con polisorbato 80 nos permitiría la administración por vía intravenosa de dosis elevadas de CXB, para la administración conjunta con otros quimioterápicos, disminuyendo los efectos adversos a nivel gastrointestinal y a nivel cardíaco asociados a este fármaco, y reduciendo el número de administraciones.

En nuestro trabajo las nanopartículas se han elaborado mediante la técnica de nanoprecipitación, que es adecuada para encapsular principios activos hidrófobos. Esta técnica también recibe el nombre de «sustitución del disolvente» (*Fessi y col., 1989; Barichello y col., 1999; Quintanar-Guerrero y col., 1999*). En esta técnica, el polímero y el principio activo se disuelven en un disolvente polar miscible en agua;

como acetona o etanol. Esta solución se adiciona bajo agitación magnética sobre una solución acuosa con un tensioactivo; como puede ser el alcohol polivinílico (PVA). El disolvente del polímero es miscible en esta solución, pero no el polímero. Por lo tanto, al ir adicionando la disolución sobre el PVA se produce la insolubilización del polímero; que precipita. Las nanopartículas se forman instantáneamente por difusión rápida del disolvente al medio acuoso, que se elimina posteriormente de la suspensión al someterla a presión reducida.

El mecanismo de formación de las partículas se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente, produciéndose una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfaz. (*Hans y Lowman, 2002*). Estas gotículas son estabilizadas rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se produce la difusión total del disolvente y por tanto, la precipitación del polímero. La utilidad de esta técnica está limitada a disolventes miscibles en agua, en los cuales el ritmo de difusión es lo suficientemente rápido como para dar lugar a la emulsificación espontánea (*Nagavarma y col., 2012*).

Tanto el tamaño de partícula como el rendimiento del proceso se ven afectados por la concentración de polímero. Generalmente se usan concentraciones de polímero comprendidas entre el 1% y el 10% (p/v). Este comportamiento se atribuye al incremento en la viscosidad de la fase orgánica. El rendimiento del proceso aumenta con el incremento en la concentración del agente estabilizante (*Niwa y col., 1993*). Se ha observado que el diámetro medio de las nanopartículas de PLGA aumenta al incrementar la concentración de PVA (*Asteste y Sabliov,*

2006). Este efecto se correlaciona con las elevadas concentraciones de PVA (2-6% p/v), que aumentan la viscosidad del medio acuoso, disminuyendo así la velocidad de difusión del disolvente.

2. OBJETIVO

El objetivo planteado ha sido desarrollar una formulación de nanopartículas biodegradables de CXB capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, para ser empleada como coadyuvante terapéutico de quimioterápicos durante los ciclos habituales del tratamiento de tumores cerebrales. Con esta formulación se pretende reducir la inflamación asociada a esta patología, mejorar la eficacia de la radioterapia e inhibir la proliferación de las células cancerígenas.

Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Obtener nanopartículas de CXB empleando un polímero biodegradable PLGA RG[®] 502.
2. Obtener nanopartículas funcionalizadas de CXB con PLGA RG[®] 502 y polisorbato 80.
3. Caracterizar las formulaciones empleando diferentes técnicas analíticas: microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de transmisión electrónica (TEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC). Determinar el potencial Z. Calcular las eficacias del proceso y de encapsulación, así

como estudiar la liberación *in vitro* del CXB a partir de las nanopartículas desarrolladas.

4. Evaluar el paso a través de la BHE de las formulaciones de nanopartículas en un modelo animal.
5. Seleccionar la formulación más adecuada para el paso a través de BHE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Método de elaboración de nanopartículas de CXB no recubiertas**

- 1) Se pesan 50 mg de PLGA 502 y 5 mg de CXB, que se disuelven en 4 ml de acetona bajo agitación en vórtex durante 2 minutos, hasta conseguir una mezcla homogénea.
- 2) La dispersión formada se añade con una pipeta *pasteur* sobre 12 ml de PVA al 0,5%.
- 3) Se mantiene en agitación constante durante 15 minutos.
- 4) Para eliminar la acetona, la suspensión de nanopartículas se lleva al rotavapor (Buchi Rotavapor-R, Suiza) durante 30 minutos a temperatura ambiente con una presión de 70 mbar.

- 5) Una vez eliminado el disolvente orgánico se centrifugan las nanopartículas durante 15 minutos a 15000 rpm (Avanti J-301 Beckman Coulter®, USA).
- 6) Se elimina el sobrenadante y se congelan las nanopartículas durante 3 horas para posteriormente liofilizarlas durante 24 horas (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, USA).

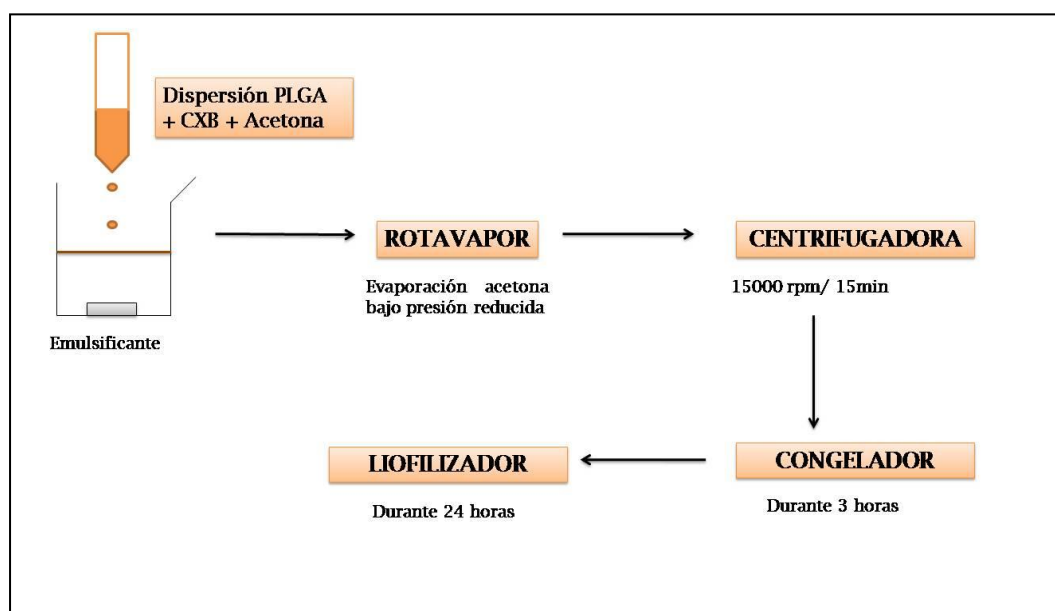


Fig. 29.- Esquema del método de preparación de las nanopartículas de CXB no recubiertas.

Por este procedimiento se han elaborado dos formulaciones: nanopartículas no cargadas o formulación 1 (F1) y nanopartículas cargadas con CXB o formulación 2 (F2).

Para los estudios *in vivo* de paso a través de BHE, es necesario elaborar nanopartículas con un marcador fluorescente: rodamina. Para elaborar las nanopartículas de rodamina (FR) se pesan 50 mg de PLGA 502 y 2,5 mg de rodamina, y se sigue el protocolo anteriormente descrito para su obtención.

○ **Método de elaboración de nanopartículas de CXB recubiertas con polisorbato 80**

Las nanopartículas se elaboran siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Se pesan 50 mg de PLGA 502 y 5 mg de CXB, se disuelven en 4 ml de acetona bajo agitación en vórtex durante 2 minutos, hasta conseguir una disolución homogénea. La dispersión formada se añade con una pipeta *pasteur* sobre 12 ml de una solución de polisorbato 80 (0,5%) y PVA (0,5%) bajo agitación magnética. Se mantiene en agitación constante durante 15 minutos. La suspensión de nanopartículas se lleva al rotavapor, para realizar la evaporación de la acetona. A continuación se centrifugan, se congelan durante 3 horas y se liofilizan durante 24 horas.

De esta manera se han preparado dos formulaciones: nanopartículas no cargadas recubiertas con polisorbato-80 (formulación F3), y nanopartículas cargadas con CXB recubiertas con polisorbato-80 (formulación F4).

Se sigue el mismo protocolo para la elaboración de nanopartículas de polisorbato 80 y rodamina (FR-80). Para ello se utilizan 50 mg de PLGA 502 y 2,5 mg de rodamina.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

El tamaño de las partículas así como su distribución de tamaños puede condicionar su proceso de distribución *in vivo*, su toxicidad y su capacidad de vectorización. Además, influyen en la eficacia de encapsulación, en la liberación del principio activo y en la estabilidad del sistema. Muchos estudios han demostrado que las nanopartículas tienen mayores ventajas que las micropartículas como sistemas de liberación controlada. Así las nanopartículas presentan en general una mayor captación intracelular y son capaces de alcanzar un número mayor de dianas biológicas gracias a su relativa movilidad (*Panyam y Labhasetwar, 2003*).

○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido permite estudiar el tamaño y la morfología de las nanopartículas. El análisis llevado a cabo por SEM aporta información de la distribución del principio activo encapsulado, lo que permite estudiar la eficacia de encapsulación así como el comportamiento del fármaco en la superficie de las nanopartículas (*Peltonen y Hirvonen, 2008*).

Mediante esta técnica se han analizado todas las formulaciones de nanopartículas preparadas. Para ello, cada una de las muestras se fija a un soporte y se recubre con una capa de 15 nm de oro coloidal, el cual

es utilizado como conductor eléctrico. Las muestras se han analizado con un microscopio electrónico de barrido JEM-6335 (Jeol Ltd, Japón).

- **Difracción de rayos láser**

Se ha determinado la distribución de tamaños de las diferentes formulaciones de nanopartículas mediante difracción de rayos láser utilizando un equipo Zetatrak® Ultra (Microtac Inc., USA). Con esta técnica se han analizado tanto las nanopartículas inertes como cargadas con CXB.

Se han obtenido las curvas de distribución de tamaños y el diámetro medio de las nanopartículas preparadas. El diámetro medio se expresa como diámetro volumen, y la distribución de tamaños se representa gráficamente mediante curvas distributivas de volumen.

- **Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

La microscopía electrónica de transmisión se basa en el uso de electrones en lugar de luz, lo que permite observar detalles de menos de 5 nm en la muestra. En un microscopio electrónico de transmisión, los electrones se obtienen de una fuente conocida como cañón de electrones (*Fultz y Howe, 2007*). Estos electrones penetran en la muestra dispersándose a través de ella, después se vuelven a enfocar con una lente de objetivo y se amplifican, mediante un proyector para finalmente producir la imagen deseada. Esta imagen se forma porque los átomos interactúan y absorben electrones en diferente extensión.

Para la preparación de este tipo de muestras hay que diluir una cantidad muy pequeña de muestra en agua, y a continuación se busca la máxima dispersión sumergiendo la solución en un baño de ultrasonidos. Al cabo de un tiempo se puede depositar una gota sobre una rejilla filmada con carbono para ser observada directamente, una vez seca.

Para la caracterización de las distintas formulaciones de nanopartículas mediante esta técnica se ha utilizado el equipo de microscopía electrónica de transmisión JEM-1010 (Jeol Ltd., Japón).

4.2. CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las nanopartículas, que condiciona la interacción de las mismas con las membranas celulares. El potencial zeta describe el comportamiento de una dispersión coloidal estabilizada eléctricamente, de manera que un sistema coloidal será estable con valores cercanos a ± 30 mV. Es deseable un valor mínimo de ± 20 mV de potencial zeta para que el sistema sea lo suficientemente estable. Nanopartículas con valores de potencial zeta comprendidos entre -10 y $+10$ mV se consideran neutras, mientras que valores superiores a $+30$ mV o inferiores a -30 mV son consideradas fuertemente catiónicas o aniónicas, respectivamente. Como la mayoría de las membranas celulares están cargadas negativamente, el potencial zeta puede condicionar la tendencia de las nanopartículas para permear a través de las membranas, de forma que las partículas con carga positiva presentan en general una mayor toxicidad sobre las membranas celulares (*Clogston y Patri, 2001*). Por otra parte, cuando las fuerzas de van der Waals son

dominantes, se pueden formar agregados, lo que conlleva a una reducción de los valores del potencial zeta, y a la pérdida de estabilidad del sistema (*Ishikawa y col., 2005*).

La determinación del potencial zeta de las nanopartículas se ha realizado en un equipo Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido). Se ha determinado el potencial zeta de las nanopartículas cargadas con CXB no recubiertas y de las nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80, analizando las muestras por triplicado. Para ello se pesan 5 mg de cada formulación liofilizada, se introducen en un matraz, se enrasa con 50 ml de agua destilada y cada muestra se mantiene en sonicador durante 5 minutos. A continuación la dispersión acuosa de nanopartículas se introduce en una célula capilar (Capillary cell enhancers®, Malvern Instruments, USA), y se procede a la lectura del potencial zeta.

4.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que mide la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. La muestra y la referencia se colocan en dos pocillos idénticos, que se calientan mediante resistencias independientes. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica se adiciona energía térmica, bien sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía

térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

El equipo empleado para llevar a cabo el análisis ha sido un DSC 820 (Mettler Toledo, USA). El ensayo se ha realizado en un rango de temperaturas de -40°C hasta 190°C, con velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo una corriente de nitrógeno. Para llevar a cabo el ensayo se pesan entre 1 y 3 mg de muestra, que se introducen en una cápsula de aluminio, la cual se sella con una tapa del mismo material (cápsula muestra). Se utiliza además una cápsula de aluminio vacía como cápsula de referencia. El estudio de DSC se ha realizado con muestras de CXB, PLGA 502, nanopartículas blancas, nanopartículas cargadas con CXB y nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80.

4.4. RENDIMIENTO DEL PROCESO Y EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

Para la determinación del rendimiento o eficacia del proceso de encapsulación se separan las nanopartículas, se pesan, y se determina la cantidad de partículas obtenidas por el método de preparación.

Por lo que se refiere a la eficacia de encapsulación, representa la relación entre la cantidad encapsulada de principio activo y la cantidad total de principio activo añadida en la preparación. Se expresa en porcentaje. El contenido en principio activo revela la cantidad real del

fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero empleado en la formulación.

Para calcular la eficacia de encapsulación de la formulación elaborada con polisorbato 80, hemos tenido en cuenta la cantidad de polisorbato que permanece en la fase interna, que formará parte de la formulación. A partir de los datos aportados por el fabricante de su solubilidad en acetona (10g/100ml) y su solubilidad en agua (5g/100ml), calculamos el coeficiente de reparto agua/acetona ($K_r = 0,5$).

El contenido de CXB de las nanopartículas se ha calculado disolviendo 10 mg de la formulación correspondiente en 1 ml de diclorometano, y agitando a continuación en vórtex para romper las nanopartículas. Para disolver el principio activo y conseguir la precipitación del polímero se añaden 5 ml de etanol a las muestras, que después se someten a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm. Las muestras recogidas se pasan por un filtro de 0,45 μm . Por último, se realizan las diluciones correspondientes previas a la cuantificación. La cuantificación del CXB se realiza mediante el método de HPLC que ha sido puesto a punto y validado previamente en el capítulo correspondiente de esta memoria experimental. La eficacia de encapsulación (EE) se ha determinado para las dos formulaciones F2 y F4, por triplicado.

4.5. ESTUDIOS DE CESIÓN

La liberación del fármaco a partir de un sistema polimérico nanoparticulado depende de diversos factores:

- Desorción del fármaco de la superficie de las nanopartículas.
- Difusión del fármaco a través de la matriz polimérica.
- Erosión de la matriz polimérica.
- Combinación de los procesos de difusión y erosión.

Las propiedades de liberación y los mecanismos implicados están basados en el coeficiente de difusión del fármaco y en la velocidad de biodegradación del polímero (*Kreuter, 1994; Soppimath y col., 2001; Siepmann y col., 2002*).

Los estudios de cesión *in vitro* se han realizado en un baño termostatzado Memmert WNB 45 (Memmert, Alemania). Los ensayos de cesión del CXB a partir de las nanopartículas se han realizado por triplicado de acuerdo al siguiente protocolo: se pesan 20 mg de nanopartículas (formulaciones F2 y F4), que se suspenden en 3 ml de tampón fosfato ajustado a pH 7,4 y con una proporción de lauril sulfato sódico (LSNa) del 3%. Hemos incorporado LSNa para mejorar la solubilidad del CXB, tal como se ha comentado anteriormente en esta memoria experimental. El volumen de 3 ml resulta adecuado para mantener las condiciones “sink” durante todo el ensayo. Las muestras se introducen en un baño termostatzado a $37 \pm 0,1$ °C con un movimiento constante de vaivén a 100 rpm. La toma de muestras se realiza a intervalos de tiempo preestablecidos.

Para la toma de muestras se extrae completamente el medio de disolución con la ayuda de una aguja acoplada a una jeringa, procediéndose a continuación a su renovación con 3 ml de solución tampón con LSNa al 3%. Las muestras obtenidas se centrifugan a 9000 rpm durante 15 minutos, se recoge el sobrenadante, se filtra a través de filtros de 0,45 μm y el contenido de principio activo se cuantifica mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 252,5 nm.

4.6. EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL PASO DE LAS NANOPARTICULAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Todos los experimentos con animales se han realizado tras la aprobación del Comité Ético de Experimentación animal de la UCM. Se emplean 6 ratas macho Wistar con pesos comprendidos entre 250 g y 300 g. Las ratas son alimentadas con piensos y agua ad libitum durante una semana para su adaptación. Las ratas se dividen en 3 grupos de 2 ratas cada uno, administrándose a cada una 50 mg/Kg de peso de nanopartículas cargadas con rodamina como marcador de fluorescencia. Se preparan diferentes formulaciones de nanopartículas en suspensión. Para la administración se emplea en todos los casos un volumen inferior a 0.5 ml, utilizándose una jeringuilla de insulina con una aguja de 25 G.

Los grupos de animales establecidos son los siguientes:

GRUPO I: 50 mg/Kg de peso de nanopartículas-rodamina (FR) en suspensión en suero salino.

GRUPO II: 50 mg/Kg de peso de nanopartículas-rodamina (FR) en suspensión de polisorbato 80 al 1% en agua destilada.

GRUPO III: 50 mg/Kg de peso de nanopartículas-polisorbato 80-rodamina (FR-80) en suspensión en suero salino.

La administración se realiza por vía i.v en la cola de los roedores (*Vilella y col., 2014*). A los 60 minutos de la administración se sacrifican los animales, se les extrae el cerebro, que se introduce en isopentano, se congela con hielo seco durante el tiempo necesario (-80°C) y se preparan secciones del mismo de 25 µm de espesor. Se realiza una tinción de las células con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (color azul) empleando un medio de montaje DPX, se dejan 24 horas en oscuridad, y finalmente se observa la fluorescencia de las nanopartículas por microscopía confocal (color rojo). Para la rodamina la longitud de onda de excitación es 540 nm y la de emisión de 570 nm.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las figuras 30-33 se muestran las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las distintas formulaciones de nanopartículas (F1, F2, F3 y F4).

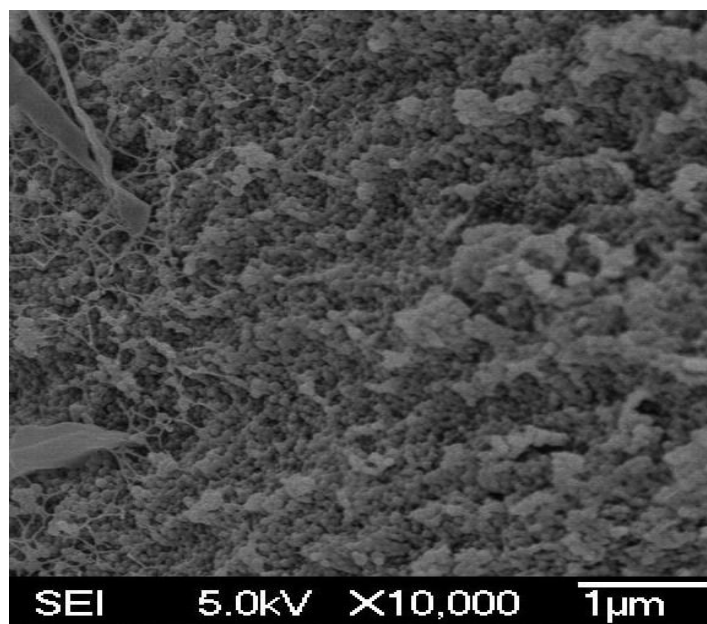


Fig. 30.- Microfotografía obtenida por SEM de las nanopartículas de PLGA 502 (Formulación F1).

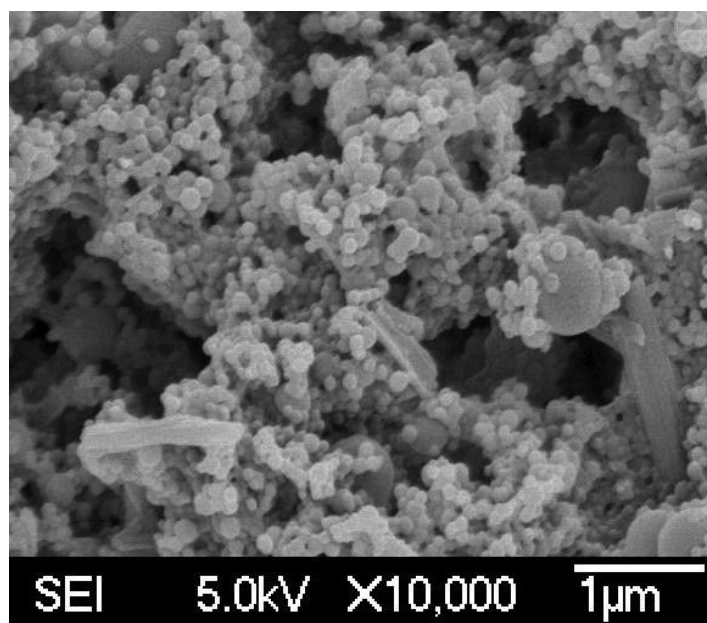


Fig. 31.- Microfotografía obtenida por SEM de las nanopartículas cargadas con CXB (Formulación F2).

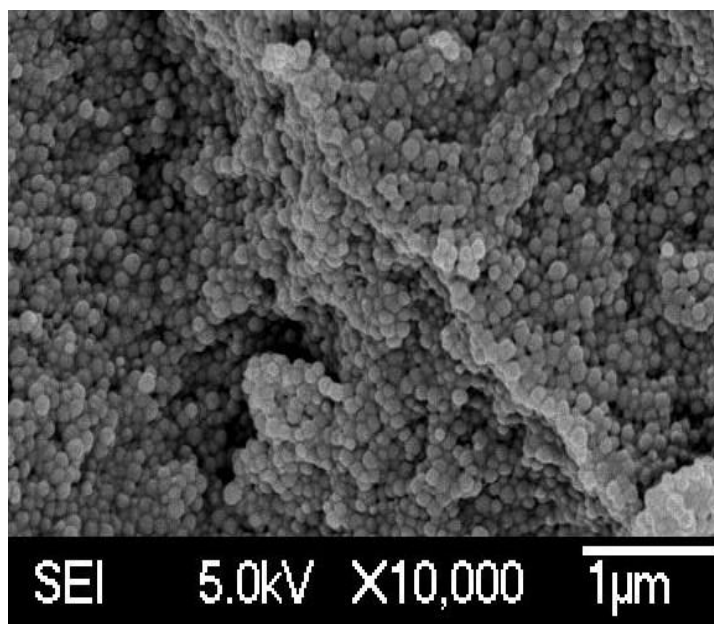


Fig. 32.- Microfotografía obtenida por SEM de las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80 (Formulación F3).

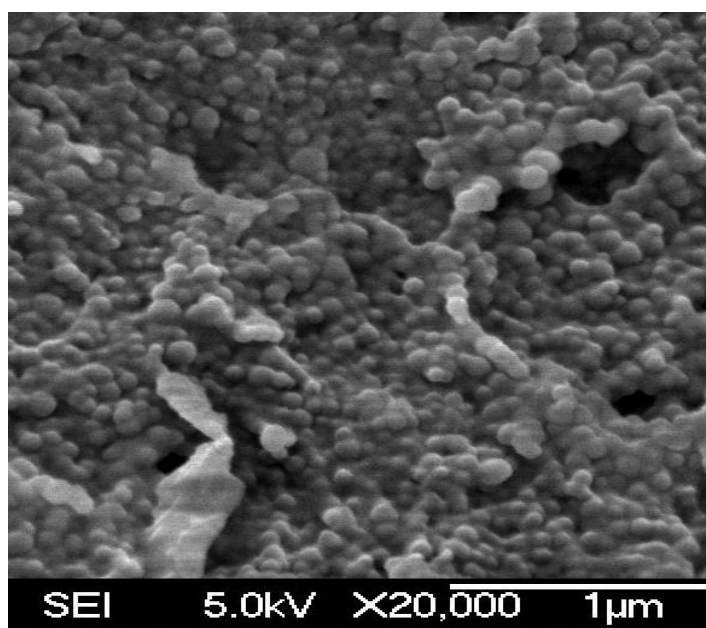


Fig. 33.- Microfotografía obtenida por SEM de las nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80 (Formulación F4).

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido nos permite comprobar que, en todos los casos, las nanopartículas no recubiertas son rígidas y esféricas, con independencia de que estén o no cargadas. No presentan cristales en el exterior, lo que indica que el principio activo se encuentra en el interior de la matriz polimérica.

La lipofilia que presentan las nanopartículas de polímeros tales como L-PLA y de PLGA hace que *in vivo* se fijen rápidamente a opsoninas y sean identificadas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Por ello, una de los requisitos más importantes de todos los nanosistemas es poseer una elevada semivida plasmática. Para evitar este hecho, se recurre a modificar la superficie de las nanopartículas con polímeros hidrófilos. Uno de los polímeros que proporciona mejores resultados es el polisorbato 80. Por este motivo se han elaborado dos tipos de formulaciones de nanopartículas, con y sin polisorbato 80.

Las nanopartículas recubiertas con polisorbato-80 son esféricas, sin embargo se puede apreciar una mayor aglomeración en comparación con las nanopartículas no recubiertas, lo que puede ser debido a la presencia del tensioactivo no iónico, que crea una película en la superficie de las mismas.

○ **Difracción de rayos láser**

El diámetro medio se expresa como diámetro volumen y la representación gráfica se realiza mediante curvas distributivas de

volumen. Los resultados obtenidos se pueden observar en las figuras 34 a 37.

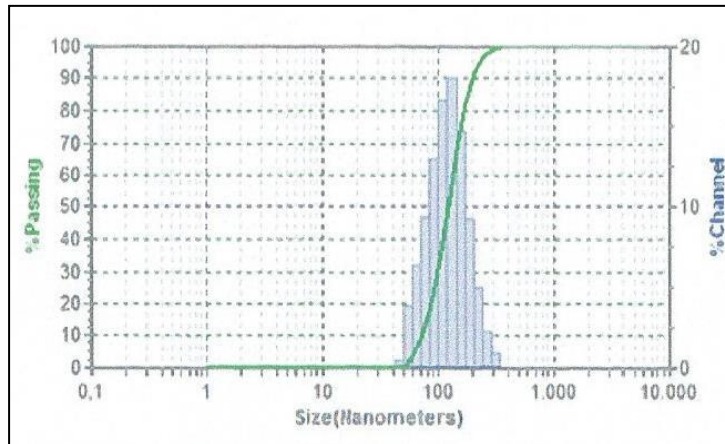


Fig. 34.- Distribución de tamaños obtenida para la formulación de nanopartículas de PLGA 502 (Formulación F1).

Para la formulación F1 el tamaño medio de partícula obtenido es de $121,8 \pm 47,8$ nm.

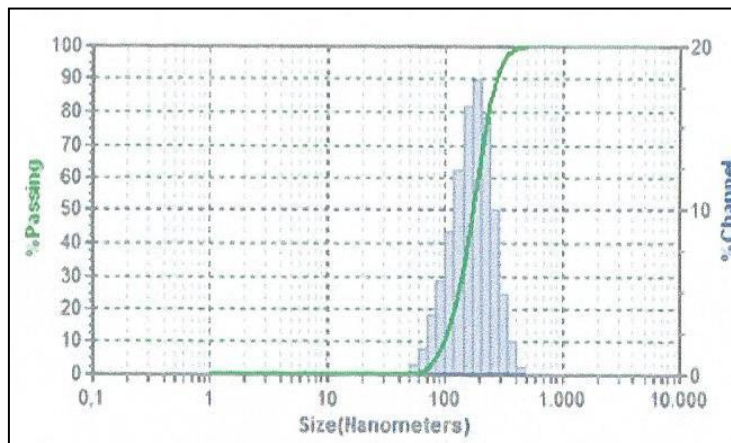


Fig. 35.- Distribución de tamaños obtenida para la formulación de nanopartículas cargadas con CXB (Formulación F2).

Para la formulación F2 el tamaño medio obtenido es de $173,6 \pm 44,90$ nm.

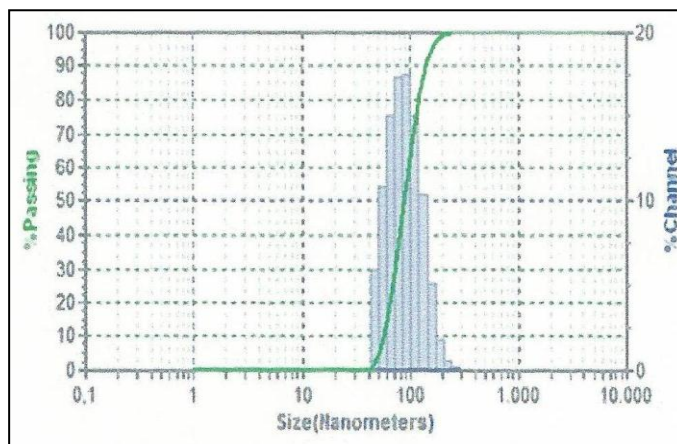


Fig. 36.- Distribución de tamaños obtenida para la formulación de nanopartículas blancas recubiertas con polisorbato 80 (Formulación F3).

Para la formulación F3 el tamaño medio obtenido es de $86,5 \pm 36,5$ nm.

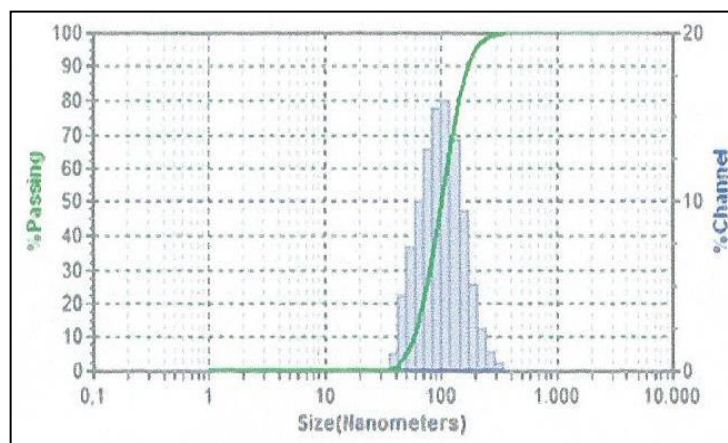


Fig. 37.- Distribución de tamaños obtenida para la formulación de nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80 (Formulación F4).

Por último, para la formulación F4 el tamaño medio resultante es de $100,6 \pm 62,1$ nm.

A partir de los resultados obtenidos se comprueba que al incorporar polisorbato 80 en la preparación de las nanopartículas, se obtiene una reducción significativa en el de tamaño de partícula, lo que indica que dicho agente es capaz de modificar sus características morfológicas. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores cuando incorporan polisorbato a diferentes formulaciones (*Mittal y col., 2011*).

Es necesario indicar que tamaños menores favorecen el paso a través de la BHE, por lo que son más adecuados para nuestro principal objetivo.

Los valores de Span obtenidos para las formulaciones no cargadas con CXB (F1 y F3) son 1,03 y 0,96 respectivamente. Para las formulaciones que llevan CXB (F2 y F4), los valores obtenidos han sido 1,01 y 1,11. Todos los valores de Span obtenidos son superiores a 0,4, lo que indica que todas las formulaciones presentan una distribución polidispersa.

- **Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

Los resultados obtenidos por microscopía de transmisión electrónica (TEM) se muestran en las figuras 38 y 39.

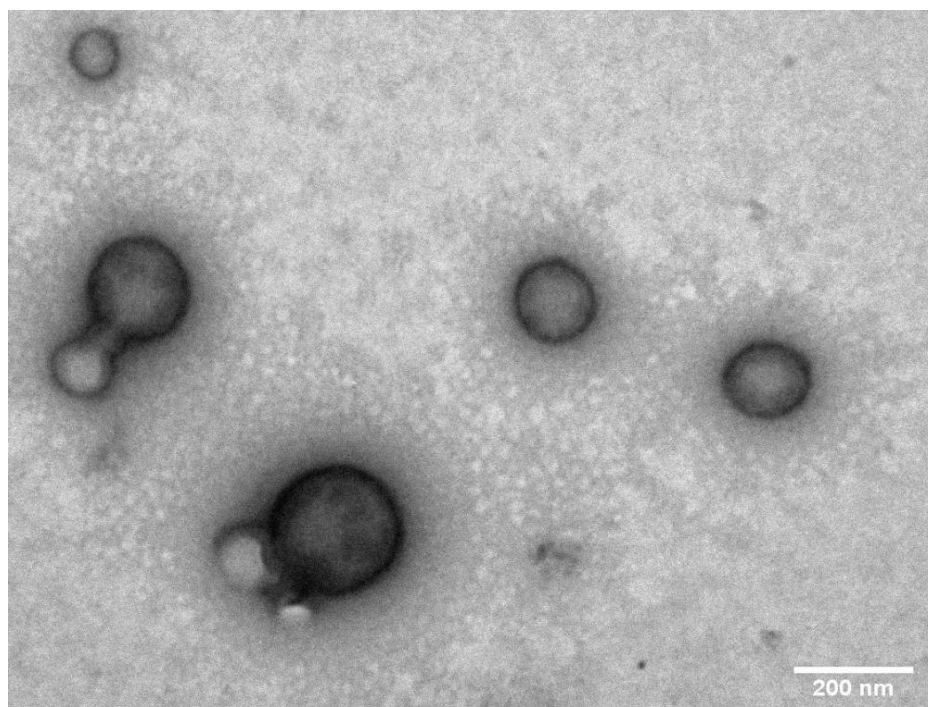


Fig. 38.- Microfotografía obtenida por TEM para la formulación de nanopartículas cargadas con CXB (Formulación F2).

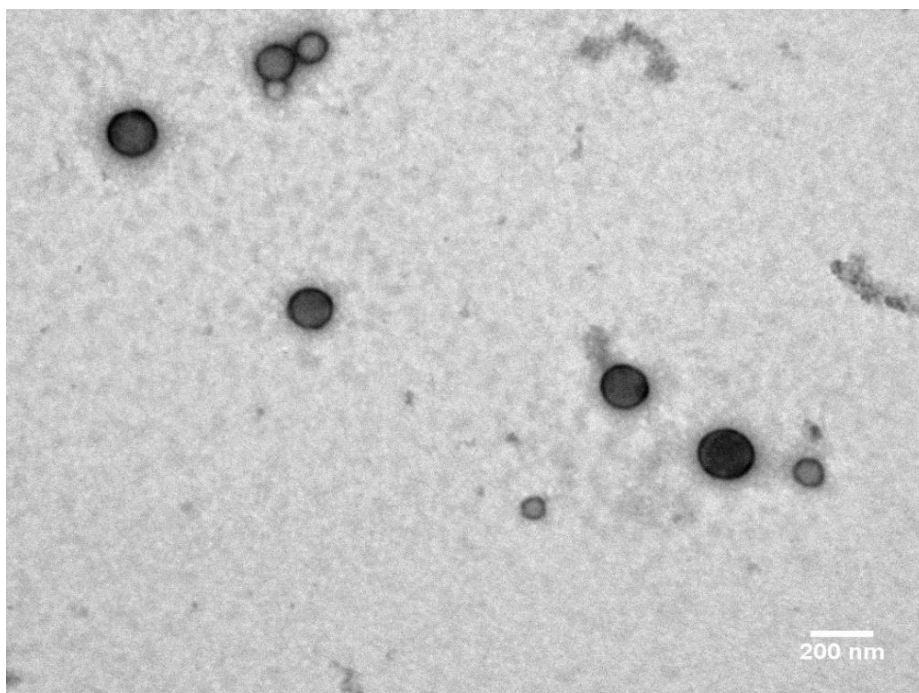


Fig. 39.- Microfotografía obtenida por TEM para la formulación de nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80 (Formulación F4).

Los resultados obtenidos mediante TEM permiten confirmar que las nanopartículas obtenidas son esféricas y con superficie lisa.

5.2. CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA

FORMULACIÓN	POTENCIAL Z (mV)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
F2	-14,1	± 0,6
F4	-20,3	± 0,9

Tabla 18.- Resultados obtenidos de potencial zeta para las formulaciones F2 y F4.

Observamos que al recubrir las nanopartículas con polisorbato 80, el potencial zeta aumenta, por lo tanto dicha formulación será más estable en suspensión, ya que su valor absoluto es mayor que el de la formulación no recubierta. Además, el cambio que se produce en el valor de potencial Z, nos confirma un cambio en la superficie, y por tanto la presencia del polisorbato en la formulación.

Se ha demostrado que partículas con valores de potencial zeta positivos producen una respuesta inmune más importante (activación del complemento) que las nanopartículas con carga neutra o negativa (Salvador-Morales y col., 2009). Las nanopartículas que contienen en su superficie una amina primaria son fagocitadas por macrófagos mucho antes que las que contienen grupos sulfato, hidroxilo o carboxilo (Alexis y col. 2008; Salvador-Morales y col., 2009). En algunos estudios se ha observado que nanopartículas con carga ligeramente negativa y con tamaños de 150 nm tienen una mayor capacidad para acumularse en tumores (Honary y Zahir, 2013).

Por tanto, los valores de potencial zeta obtenidos en nuestro estudio permiten que las formulaciones permanezcan más tiempo en el torrente sanguíneo, ya que así se consigue una disminución de la opsonización de las partículas.

5.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

En la figura 40 se muestran los termogramas obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

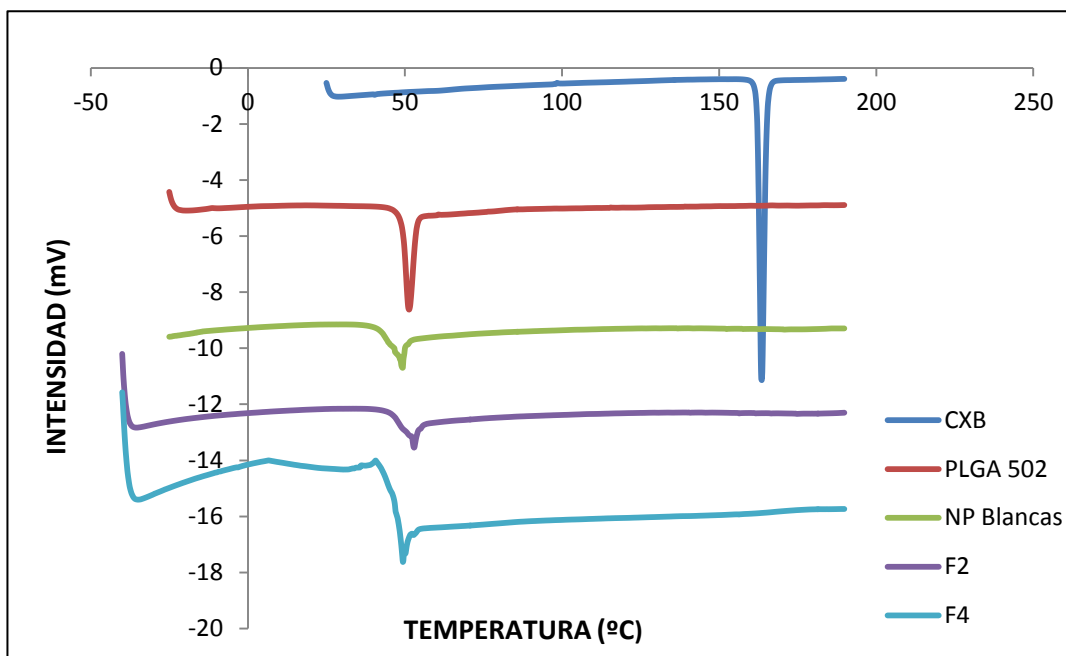


Fig. 40.- Termogramas obtenidos para CXB, PLGA 502, nanopartículas blancas, y formulaciones F2 y F4.

En el termograma obtenido para el CXB se observa un pico endotérmico a una temperatura de 158,66 °C, valor que se corresponde con los datos de la bibliografía relativos al punto de fusión de este compuesto, y que está descrito entre 156 °C y 159 °C (*Simon y col., 1998*).

La temperatura de transición vítrea (T_g) representa la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de los polímeros. El termograma correspondiente al polímero PLGA 502 muestra una temperatura de transición vítrea de 43,8 °C, similar a los datos recogidos en la literatura para este polímero (*Graves y col., 2004*).

En el termograma correspondiente a las microesferas no cargadas (formulación F1) se observa un descenso en la temperatura de transición vítrea ($T_g = 41,1$ °C). Este descenso puede deberse a la presencia de restos de disolvente orgánico o bien a errores derivados de la propia técnica.

Por lo que se refiere a las nanopartículas cargadas con CXB (formulación F2), se puede observar que la temperatura de transición vítrea ($T_g = 43,33$ °C), se mantiene prácticamente inalterada, sin embargo las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80 (formulación F4) muestra un descenso en la temperatura de transición vítrea ($T_g = 40,3$ °C), probablemente debido a que se produce algún tipo de interacción entre ambos polímeros.

5.4. RENDIMIENTO DEL PROCESO Y EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

FORMULACIÓN	RENDIMIENTO DEL PROCESO (%)	MEDIA (%) \pm D.E.
F 2.1	45,89	45,41 \pm 3,80
F 2.2	51,26	
F 2.3	39,07	
F 4.1	40,73	34,03 \pm 5,85
F 4.2	28,91	
F 4.3	32,45	

Tabla 19.- Resultados obtenidos para el rendimiento del proceso (%) y correspondientes a las formulaciones F2 y F4.

El rendimiento medio del proceso para la formulación F2 fue de 45,41 \pm 3,80% y de 34,03 \pm 5,85% para la formulación F4, obteniéndose en consecuencia un rendimiento ligeramente inferior en el caso de la elaboración de nanopartículas de CXB recubiertas con polisorbato 80.

Se ha determinado la eficacia de encapsulación para las nanopartículas cargadas con CXB y las nanopartículas cargadas con CXB y recubiertas con polisorbato 80 (formulaciones F2 y F4), cuyos resultados se resumen en la tabla 20.

FORMULACIÓN	CANTIDAD ENCAPSULADA 10 mg ME	EFICACIA ENCAPSULACIÓN (%)	EFICACIA ENCAPSULACIÓN (media ± D.E.) (%)
Formulación 2.1	759,77 µg	83,57	83,75 ± 2,36
Formulación 2.2	790,86 µg	86,91	
Formulación 2.3	735,13µg	80,79	
Formulación 4.1	321,13µg	66,15	70,18 ± 3,59
Formulación 4.2	354,70µg	73,02	
Formulación 4.3	346,52µg	71,38	

Tabla 20.- Resultados obtenidos para la eficacia de encapsulación (%) del CXB y correspondientes a las formulaciones F2 y F4.

La eficacia de encapsulación media que se ha obtenido para la formulación F2 es de $83,75 \pm 2,36\%$ y para la formulación F4 de $70,18 \pm 3,59\%$.

Para realizar el cálculo de la eficacia de encapsulación se ha tenido en cuenta el coeficiente de reparto del polisorbato 80. Por tanto se considera en el peso de las nanopartículas (10 mg) tanto la cantidad de PLGA, como la de polisorbato-80, una vez confirmada su presencia en la formulación. La afinidad del polisorbato 80 por la acetona, así como su elevada solubilidad en este disolvente, hace que disminuya de forma acusada la cantidad de CXB encapsulada. Aún teniendo en cuenta la presencia de polisorbato 80 en la matriz polimétrica, la eficacia de

encapsulación es inferior a la obtenida para las nanopartículas elaboradas sin polisorbato 80. Este hecho probablemente se deba a que se produce una modificación en la afinidad del CXB por la matriz polimérica, que se vuelve ligeramente más hidrófila.

5.5. ESTUDIOS DE CESIÓN

Los ensayos de cesión *in vitro* del CXB a partir de las nanopartículas se han realizado por triplicado para las formulaciones F2 y F4. El medio empleado ha sido tampón fosfato ajustado a pH 7,4 y preparado con LSNa al 3%.

En las tablas 21 y 22 se recogen los resultados individuales y medios de cesión del CXB a partir de las formulaciones F2 y F4, respectivamente.

Tiempo (días)	Cantidad cedida acumulada lote 1 (µg)	Cantidad cedida acumulada lote 2 (µg)	Cantidad cedida acumulada lote 3 (µg)	% Cedido acumulado Lote 1	% Cedido acumulado Lote 2	% Cedido acumulado Lote 3	% Cedido acumulado medio	D.E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,04	114,28	146,74	77,31	7,50	9,64	5,08	7,40	2,28
0,10	195,83	207,23	146,36	12,86	13,61	9,61	12,03	2,01
0,25	263,08	255,40	205,22	17,27	16,77	13,47	15,84	1,70
0,35	285,38	280,80	234,51	18,74	18,44	15,40	17,52	1,56
1,00	349,10	345,91	300,44	22,92	22,71	19,73	21,79	1,53
1,33	368,42	368,64	318,20	24,19	24,21	20,89	23,10	1,69
2,00	395,29	396,06	336,11	25,95	26,01	22,07	24,68	2,00
3,04	428,52	423,54	375,78	28,14	27,81	24,67	26,87	1,61
6,25	482,17	467,28	436,02	31,66	30,68	28,63	30,32	1,10
13,00	557,17	524,89	475,00	36,58	34,46	31,19	34,08	1,79
16,04	590,36	548,60	508,60	38,76	36,02	33,39	36,06	1,53
20,08	639,64	591,44	549,84	42,00	38,83	36,10	38,98	1,62
23,17	671,38	620,89	577,60	44,08	40,77	37,93	40,92	1,69
27,17	723,80	664,94	617,04	47,52	43,66	40,51	43,90	1,89
30,17	776,22	708,99	653,53	50,97	46,55	42,91	46,81	2,18
34,17	899,26	823,21	748,22	59,04	54,05	49,13	54,07	2,85
36,17	961,23	904,26	832,53	63,11	59,37	54,66	59,05	2,63
41,50	1174,34	1144,34	1056,38	77,11	75,14	69,36	73,87	3,04
48,17	1338,13	1393,36	1274,53	87,86	91,49	83,69	87,68	3,90
54,21	1455,11	1521,79	1414,20	95,54	99,92	92,86	96,11	3,54
61,25	1500,42	1554,80	1436,29	98,52	102,09	94,31	98,30	3,89

Tabla 21.- Cantidades y porcentajes cedidos acumulados de CXB en los ensayos de cesión realizados con tampón fosfato a pH 7,4 con LSNa al 3%, y para los tres lotes de nanopartículas preparadas con PLGA 502 (formulación F2). Valores individuales y medios (\pm D.E.).

Tiempo (días)	Cantidad cedida acumulada lote 1 (µg)	Cantidad cedida acumulada lote 2 (µg)	Cantidad cedida acumulada lote 3 (µg)	% Cedido acumulado Lote 1	% Cedido acumulado Lote 2	% Cedido acumulado Lote 3	% Cedido acumulado medio	D.E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,04	94,61	117,20	115,92	13,89	17,21	17,02	16,04	1,86
0,10	121,11	171,76	166,77	17,78	25,22	24,49	22,50	4,10
0,25	129,87	186,51	189,20	19,07	27,39	27,78	24,75	4,92
0,33	132,85	192,38	195,37	19,51	28,25	28,69	25,48	5,18
1,02	149,33	206,58	204,62	21,93	30,34	30,05	27,44	4,77
1,33	154,96	212,35	210,52	22,75	31,18	30,91	28,28	4,79
3,00	166,58	224,00	216,26	24,46	32,89	31,76	29,70	4,57
8,00	185,64	243,43	246,43	27,26	35,75	36,19	33,06	5,03
15,00	206,38	263,98	266,98	30,31	38,76	39,20	36,09	5,02
21,67	223,12	280,30	287,96	32,76	41,16	42,28	38,74	5,20
27,71	238,82	294,23	302,74	35,07	43,21	44,46	40,91	5,10
34,75	283,17	334,24	343,60	41,58	49,08	50,46	47,04	4,78
41,79	363,79	416,13	401,96	53,42	61,11	59,03	57,85	3,98
50,83	470,29	537,18	524,42	69,06	78,88	77,01	74,98	5,21
55,88	521,82	579,79	567,62	76,63	85,14	83,35	81,70	4,49
64,29	583,24	657,85	621,43	85,64	96,60	91,25	91,17	5,48

Tabla 22.- Cantidades y porcentajes cedidos acumulados de CXB en los ensayos de cesión realizados con tampón fosfato a pH 7,4 y LSNa al 3%, y para los tres lotes de nanopartículas preparadas con PLGA 502 y polisorbato 80 (formulación F4). Valores individuales y medios (\pm D.E.).

En las figuras 41 y 42 se muestran los perfiles de cesión medios (\pm D.E.) de CXB obtenidos para las formulaciones F2 y F4, respectivamente.

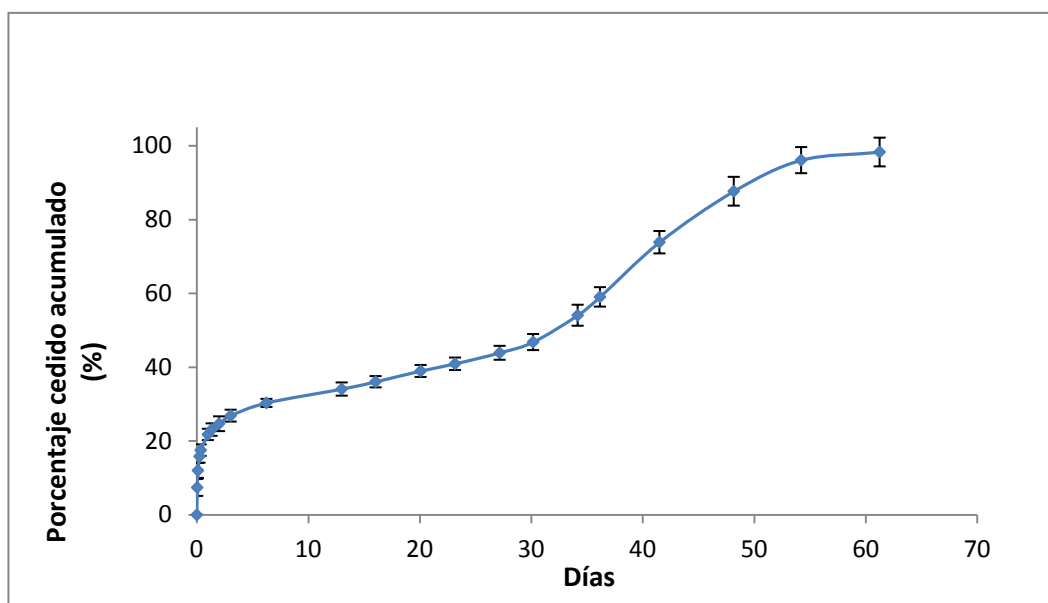


Fig. 41.- Porcentajes medios cedidos acumulados de CXB ($\pm D.E.$) correspondientes a la formulación F2.

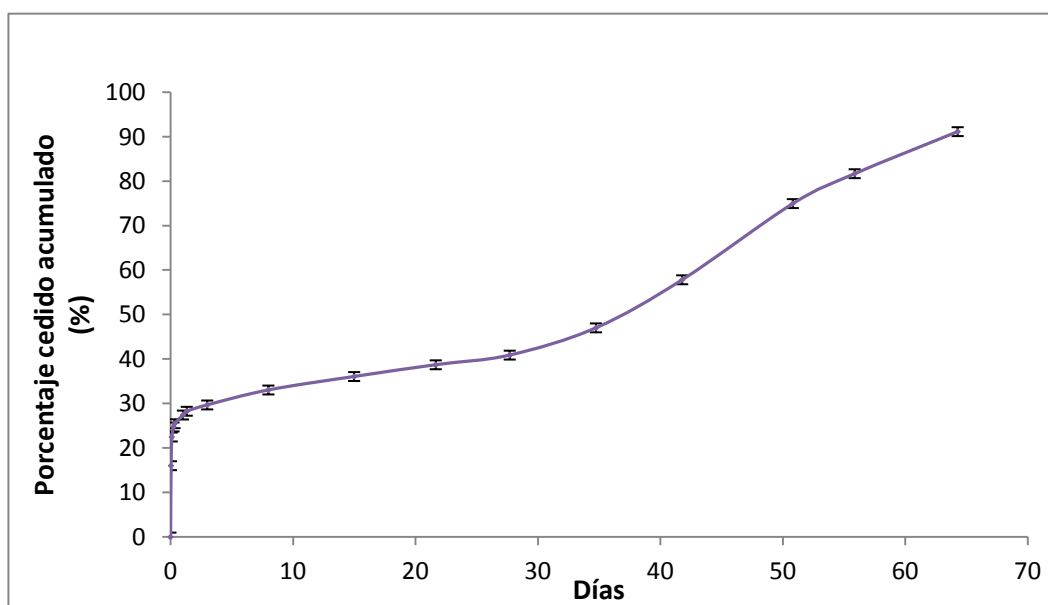


Fig. 42.- Porcentajes medios cedidos acumulados de CXB ($\pm D.E.$) correspondientes a la formulación F4.

En ambos casos se puede observar una cesión inicial o efecto “burst”, indicativo de la existencia de principio activo adsorbido en la superficie de la nanopartícula. Dicho efecto representa una cesión inicial media de aproximadamente el 20-25% de CXB para ambas formulaciones.

A continuación se observan dos cinéticas de liberación; la primera de ellas es más lenta probablemente debido al predominio del proceso de difusión durante esta fase. La segunda es una liberación más rápida, lo que puede deberse a que junto al proceso de difusión se produce un proceso de erosión.

Al final del ensayo de cesión las nanopartículas de la formulación F2 han cedido el $98,30 \pm 3,89\%$ del principio activo encapsulado, y para la formulación 4 se ha cedido el $91,17 \pm 3,11\%$ del CXB.

5.6. ESTUDIOS DE PASO A TRAVÉS DE BHE

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Wistar a las que se le administra, a través de la vena de la cola, diferentes formulaciones de nanopartículas en suspensión: NPs de rodamina (FR) suspendidas en suero salino; NPs cargadas con rodamina suspendidas en polisorbato 80 al 1% y NPs de polisorbato 80 cargadas con rodamina (FR80).

En las figuras 43 a 45 se muestran las microfotografías obtenidas procedentes de cortes de corteza cerebral para las tres formulaciones ensayadas.

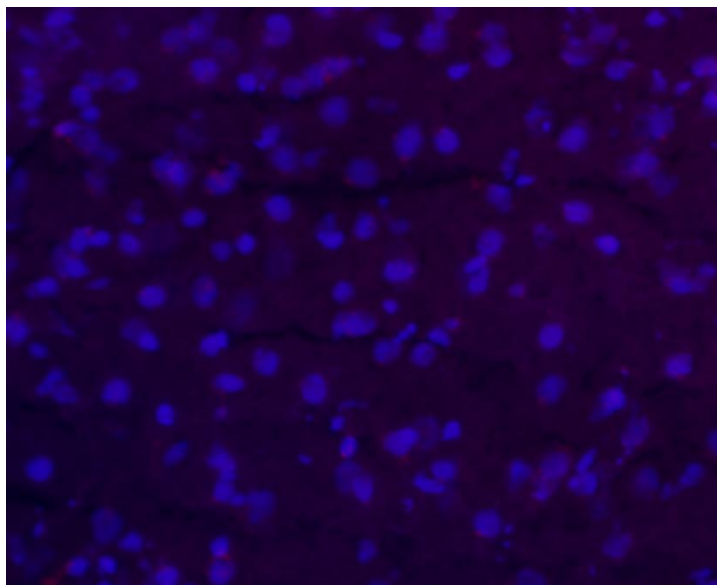


Fig. 43.- Microfotografía de corteza cerebral tras la administración de nanopartículas de rodamina suspendidas en suero salino.

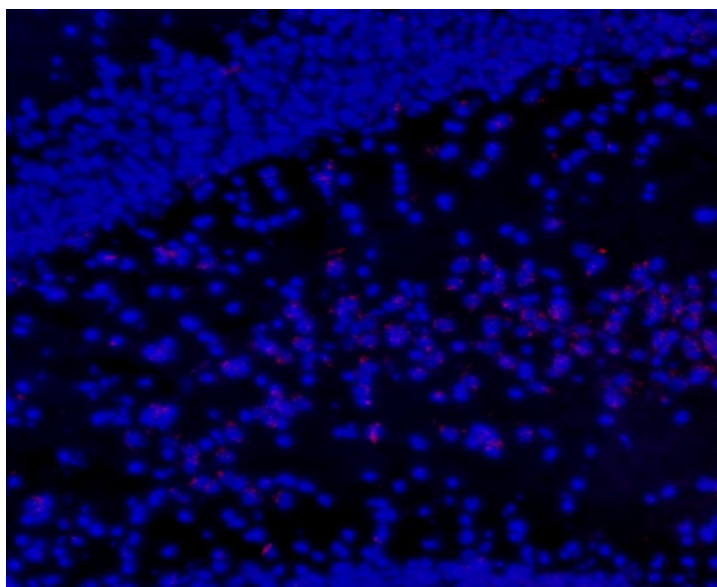


Fig. 44.- Microfotografía de corteza cerebral tras la administración de nanopartículas de rodamina suspendidas en polisorbato 80 al 1%.

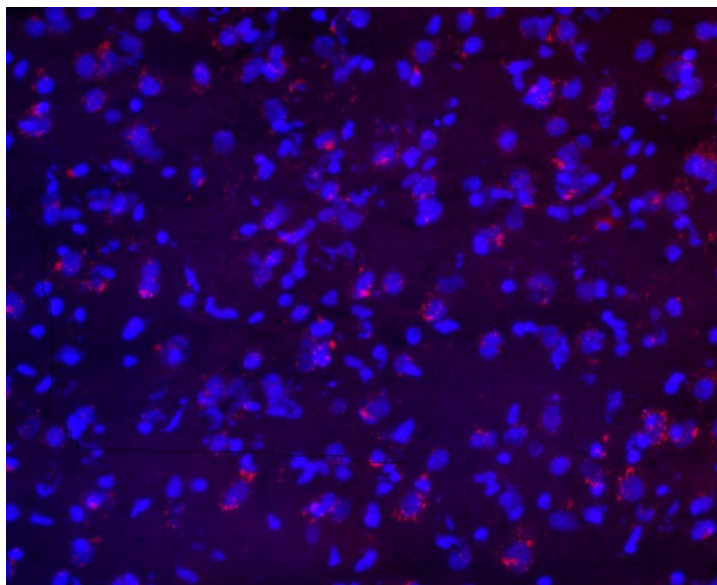


Fig 45.- Microfotografía de corteza cerebral tras la administración de nanopartículas de PLGA elaboradas con polisorbato 80 cargadas con rodamina (FR80).

El DAPI es un colorante nuclear que se excita a 358 nm con luz ultravioleta para producir una fuerte fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN. Esta tinción nos permite observar los núcleos de las células. La rodamina es un colorante fluorescente que se une a las membranas de las mitocondrias, y cuya presencia puede observarse por la aparición de color rojo.

Ha sido ampliamente estudiado el empleo de polímeros modificadores de la superficie de las nanopartículas; así una de las primeras estrategias empleadas se basa en el uso del polietilenglicol, ya que al tratarse de un polímero hidrófilo se consigue aumentar la semivida de estos nanosistemas, debido a un impedimento estérico que reduce la fagocitosis. Algunos autores indican que el polisorbato 80

también es capaz de reducir la fagocitosis, aumentando el número de nanosistemas que son capaces de llegar a la BHE. En este sentido existen numerosos estudios que demuestran que la presencia de polisorbato 80 en la superficie de los nanovehículos favorece su paso a través de la BHE (*Kreuter, 2003; Ambruosi y col., 2006*). Algunos autores indican que el paso a través de BHE no es consecuencia únicamente de un aumento en la semivida (*Kreuter, 2001; Michaelis y col., 2006*), sino que se postula que la apolipoproteína (ApoE) del plasma es adsorbida en la superficie de las nanopartículas cuando se encuentran revestidas con polisorbato 80. Esta proteína es reconocida por los receptores expresados en la superficie de las células endoteliales de la BHE como una proteína de baja densidad (LDL) y por tanto, es transportada a través de la barrera (*Kreuter, 2003; Steiniger y col., 2004; Michaelis y col., 2006; Wohlfart y col., 2011*).

Aunque algunos autores consiguen aumentar el paso de las nanopartículas a través de la BHE únicamente suspendiendo la formulación en polisorbato 80. En nuestro caso, cuando suspendemos la formulación en polisorbato 80, únicamente se observa un ligero aumento en la fluorescencia, como se muestra en la figura 44. Sin embargo, las nanopartículas que han sido elaboradas con polisorbato 80 (Fig.45) muestran una mayor fluorescencia emitida por la rodamina en los cortes histológicos realizados en corteza. Debido al pequeño tamaño de la formulación (nanométrico) no podemos indicar que la fluorescencia que se observa se deba a la rodamina encapsulada en las nanopartículas, pero sí podemos afirmar que tras la administración de las nanopartículas elaboradas con polisorbato 80 se produce un aumento importante en la fluorescencia en corteza, debido probablemente a un mayor paso de

nanopartículas a través de la BHE y/o a una posterior liberación de la rodamina en el lugar de acción.

6. CONCLUSIONES

1. La técnica de elaboración es adecuada para la obtención de nanopartículas de CXB, ya que presentan un tamaño adecuado, inferior a 200 nm, que permitirá su paso a través de la barrera hematoencefálica. En todos los casos se obtiene una liberación controlada del principio activo durante al menos 50 días.
2. La presencia de polisorbato 80 en la formulación disminuye el tamaño de las nanopartículas, que presentan un tamaño medio de 100 nm., y se mejora su potencial Z (-20,3 mV), dando más estabilidad a la suspensión. Ambos factores favorecerán su paso a través de barrera hematoencefálica. Sin embargo, la carga de celecoxib en las nanopartículas se encuentra reducida, lo que nos obligará a aumentar la dosis.
3. El paso a través de la barrera hematoencefálica observado en los estudios *in vivo*, muestra claramente una mayor fluorescencia tras la administración de la nanopartículas elaboradas con polisorbato 80. Aunque no podemos confirmar que la fluorescencia observada corresponda a la rodamina encapsulada en las nanopartículas, sí podemos afirmar que se produce un marcado incremento de la fluorescencia en la corteza cerebral tras la administración de

las nanopartículas elaboradas con polisorbato 80, lo que probablemente se deba a un mayor paso a través de la barrera hematoencefálica de esta formulación y a la posterior liberación de rodamina.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbott N.J., Patabendige A.A., Dolman D.E., Yusof S.R., Begley D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.*, 37(1):13–25, 2010.

Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*, 5 (4): 505-515, 2008.

Ambruosi A., Khalansky A.S., Yamamoto H., Gelperina S.E., Begley D.J., Kreuter J. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [C-14]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *J. Drug Target.*, 14 (2): 97-105. 2006

Astete C.E., Sabliov C.M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17: 247-89, 2006.

Barichello J.M., Morishita M., Takayama K., Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25: 471- 476, 1999.

Begley D., Kreuter J. Do ultra-low frequency (ULF) magnetic fields affect the blood-brain barrier. En M.F. Holick, EG. Jung (Eds.). *Biologic Effects of Light*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 297-301, 1999.

Brannon-Peppase L., Blanchette J.Q. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(11): 1649-1659, 2004.

Chen D., Lee K.H. Biodistribution of calcitonin encapsulated in liposomes in mice with particular reference to the central nervous system, *Biochem. Biophys. Acta*, 1158: 244-250, 1993.

Chen Y., Dalwadi G., Benson H.A.E. Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr. Drug Deliv.*, 1: 361-76, 2004.

Clogston J.D., Patri A.K. Zeta potential measurement. *Methods Mol. Biol.*, 697: 63-70, 2011.

Couvreux P., Grislain L., Lenaerts V., Brasseur F., Guiot P., Biernacki A. Biodegradable polymeric nanoparticles and drug carriers for antitumor agents, in: P. Guoit, P. Couvreur (Eds.), *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, Boca Raton, FL, 27-93, 1986.

Davson H., Segal M. Physiology of the CSF and Blood–Brain Barrier, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-192, 1996.

De Boer A.G., Van Der Sandt I.C., Gaillard P.J. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43:629-56, 2003.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, 55:R1- R4, 1989.

Fultz B., Howe J. Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials, 4th ed., Springer-Verlag, Berlín, 85-93, 2007.

Goldstein G.W., Betz A.L. The blood-brain barrier. *Sci. Am.*, 255: 74-83, 1986.

Graves R.A., Pamujula S., Moiseyev R., Freeman T., Bostanian L.A., Mandal T.K. Effect of different ratios of high and low molecular weight PLGA blend on the characteristics of pentamidine microcapsules. *Int. J. Pharm.*, 270(1-2): 251-262, 2004.

Grislain L., Couvreur P., Lenaerts V., Roland M., Deprez D., Decampeneere, P. Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier, *Int. J. Pharm.*, 15: 335-345, 1983.

Gulyaev A.E., Gelperina S.E., Skidan I.N., Antropov A.S., Kivman G.Y., Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm.. Res.*, 16(10): 1564-1569, 1999.

Hans M.L, Lowman A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targetting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 6: 319-327, 2002.

Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.*, 9: S3-5, 2008.

Honary S., Zahir F. Effect of Zeta potencial on the properties of nano-drug delivery systems: a review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 12 (2): 265-273, 2013.

Ishikawa Y., Katoh Y., Ohshima H. Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: effect of pH and salt concentration. *Colloid Surf. B.*, 42: 53-58, 2005.

Koziara J.M., Lockman P.R., Allen D.D., Mumper R.J. The blood-brain barrier and brain drug delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 6: 2712-35, 2006.

Kreuter J. Nanoparticles. En Swarbrick J. and Boylan J.C. (eds.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 10. Marcel Dekker, New York, 1994.

Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Del. Rev.*, 47: 65-81, 2001.

Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 4 (5): 484-488. 2003

Kreuter J., Alyautdin R.N., Kharkevich D.A., Ivanov A.A. Passage of peptides through the blood–brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.*, 74: 171-174, 1995.

Kreuter J., Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*, 94: 271-277, 2008.

Michaelis K., Hoffmann M.M., Dreis S., Herbert E., Alyautdin R.N., Michaelis M., Kreuter J., Langer K. Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin-nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317: 1246-1253, 2006.

Mittal G., Carswell H., Brett R., Currie S., Ravi Kumar M.N.V. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *J. Control. Release*, 150:220-228, 2011.

Nagavarma B.V.N., Hemant K.S., Ayaz A., Vasudha L.S., Shivakumar H.G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles: a review. *Asian J. Pharm Clin Res.*, 5: 16-23, 2012.

Newton H.B. Advances in strategies to improve drug delivery to brain tumors. *Expert Rev. Neurother.*, 6: 1495-509, 2006.

Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behaviour. *J. Control Release*, 25: 89-98, 1993.

Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55: 329-347, 2003.

Pardridge W.M. Brain Drug Targeting: the Future of Brain Drug Development. Cambridge University Press, Cambridge, p. 36-81, 2010.

Pardridge W.M. The blood-brain barrier. Permeability, substrate transport and drug and gene targeting. *Cerebral blood flow and metabolism*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 119-139, 2002.

Pardridge W.M., Buciak J.L., Friden J.M. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood–brain barrier in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259: 66-70, 1991.

Peltonen L., Hirvonen J. Physicochemical characterization of nano- and microparticles. *Curr. Nanosci.*, 4: 101-107. 2008.

Quintanar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H., Doelker E. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int. J. Pharm.*, 188: 155-64, 1999.

Salvador-Morales C., Zhang L., Langer R., Farokhzad O.C. Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups. *Biomaterials*, 30: 2231-2240, 2009.

Scherrmann J.M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.*, 38: 349-54, 2002.

Schroeder U., Sommerfeld P., Sabel B.A. Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood–brain barrier. *Peptides*, 19(4): 777-780, 1998.

Siepmann J., Faisant B., Benoit, J.P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharm. Res.*, 19: 1885-1893, 2002.

Simon L.S., Lanza F.L., Lipsky F.L., Hubbard R.C., Walter S., Schwartz B.D., Isakson P.C., Geis G.S. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor - Efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoidarthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum.*, 41: 1591-1602, 1998.

Soppimath K.S, Aminabhavi T.M, Kulkarni A.R, Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, 70: 1-20, 2001.

Steiniger S.C.J., Kreuter J. Khalansky A.S. Skidan I.N., Bobruskin A.I., Smirnova Z.S., Severin S.E., Uhl R., Kock M., Geiger, K.D. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer*, 109 (5): 759-767. 2004

Vilella A., Tosi, G., Grabrucker A.M., Ruozi B., Belletti D., Vandelli M.A., Boeckers T.M., Forni F., Zoli M. Insight on the fate of CNS-

targeted nanoparticles. Part I: Rab5-dependent cell-specific uptake and distribution. *J. Control. Release*, 174: 195-201. 2014.

Wilson B., Samanta M.K., Santhi K., Kumar K.P.S., Paramakrishnan N., Suresh B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70: 75-84. 2008.

Wohlfart S., Khalansky A., Svetlana G., Begley D., Kreuter J. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood-brain barrier. *J. Control. Release*, 154 (1): 103-107. 2011.

Yokoyama M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J. Artif. Organs*, 8(2):77-84, 2005.

Zensi A., Begley D., Pontikis C., Legros C., Mihoreanu L., Büchel C., Kreuter J. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the bloodbrain barrier and enter the rodent brain. *J. Drug Target.*, 18: 842-848, 2010.

Zhou X., Huang L. Targeted delivery of DANN by liposomes and polymers, *J. Control Release*, 19: 269-274, 1992.

Zlokovic B.V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57: 178-201, 2008.

SUMMARY

INTRODUCTION

Celecoxib (CXB) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties. It is approved for the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and acute pain. CXB has proven effective to reduce human glioblastoma cell viability both *in vitro* and in rodent models.

OBJECTIVE

The main objective of this doctoral thesis is the development of two controlled release systems of CXB for the treatment of cerebral tumors. One of the therapeutic systems consists of biodegradable PLGA microparticles intended to be implanted in the brain after partial or complete removal of the tumor, and which will reduce the inflammation and/or post-traumatic oedema and improve the efficacy of radiotherapy. The other therapeutic system consists of biodegradable nanoparticles functionalized with polysorbate 80 and destined to cross the blood-brain barrier (BBB) in order to reduce inflammation, angiogenesis and potentiate the effects of radiotherapy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

- Development and validation of two analytical methods for the quantification of CXB: UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC).

- Tests in cell cultures (cell lines PC12, SKN-AS, U373-MG) performed to evaluate cell viability and ROS (reactive oxygen species) production after exposure to increasing concentrations of CXB.
- Development and characterization of biodegradable microspheres of CXB prepared with PLGA 503 (polylactic-co-glycolic acid).
- Development and characterization of biodegradable nanoparticles of CXB prepared with PLGA 502 and functionalized with polysorbate 80.
- Studies of the transport of CXB nanoparticles functionalized with polysorbate 80 across the BBB of rats.

RESULTS AND DISCUSSION

- Two analytical methods for the quantification of CXB (UV spectrophotometry and HPLC) encapsulated in micro- and nanoparticles have been developed and validated. Both methods comply with the validation requirements being linear, accurate, precise, selective and sensitive.
- Cell viability studies performed in PC12, SKN-AS, U373-MG cells after exposure for 24 h to increasing concentrations of CXB showed that all cell lines were sensitive to the drug thereby demonstrating its antiproliferative effect.

- A new microencapsulation method for CXB has been developed based on the extraction-evaporation technique from an O/W emulsion and using PLGA 503 as polymer. Two formulations were prepared with CXB loads of 10% (F1) and 20% (F2), respectively. Mean particle sizes were around 60 μm . Mean encapsulation efficacy obtained for formulation F2 was $74,57 \pm 2,15\%$, lower than that obtained for formulation F1, however the former was prepared with a higher load of CXB (20%) and exhibited zero-order release for 37 days (mean $K_0 = 39,71 \mu\text{g/day/20 mg microspheres}$), which better complies with our objectives.
- CXB nanoparticles were prepared from the nanoprecipitation method using PLGA 502 and then functionalized with polysorbate 80. CXB nanoparticles exhibited mean particle sizes of 200 nm, which are suitable for crossing the BBB.
- Functionalization of the formulation with polysorbate 80 reduced nanoparticle size (mean diameter 100 nm) and improved zeta potential (-20,3 mV), thereby enhancing its stability. Both factors will favour the passage of the formulation across the BBB.
- Animal studies conducted to evaluate the transport of CXB nanoparticles functionalized with polysorbate 80 across the BBB of rats showed a marked increase of fluorescence from the brain cortex, probably due to the passage of the nanoparticles and latter release of rhodamine.